

10/587831

Testsystem und Verfahren zum Nachweis von Analyten

Die vorliegende Erfindung betrifft ein analytisches Testsystem und Verfahren zum spezifischen und sensitiven Nachweis von Analyten in einer zu untersuchenden Probe.

Für den Nachweis und die Quantifizierung von Substanzen stehen zahlreiche analytische Verfahren zur Verfügung. Prinzipiell können hierbei Verfahren unterschieden werden, die die zu analysierende bzw. nachzuweisende Substanz, den Analyten, direkt oder indirekt nachweisen. Bei direkten Verfahren werden charakteristische physiko-chemische Eigenschaften des Analyten ausgenutzt, um diesen möglichst spezifisch und sensitiv nachzuweisen. Hierbei werden beispielsweise chromatographische Verfahren wie die High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) oder die Gaschromatographie (GC) eingesetzt. Außerdem werden Techniken aus den Bereichen der Spektrophotometrie, der Resonanzspektroskopie, der Massenspektroskopie, etc. verwendet (Becker, Berger et al. 1993; Hesse, Meier et al. 1995; Rehm 2002); vgl. Literaturliste am Ende der Beschreibung.

Prinzipiell werden bei indirekten Nachweisverfahren die Techniken eingesetzt, die auch bei direkten analytischen Verfahren Verwendung finden. Allerdings werden hier zusätzliche, spezifische Bindungsvorgänge oder chemische Reaktionen ausgenutzt, um Analyten entsprechend ihrer sterischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften spezifisch und sensitiv nachzuweisen. Mit Hilfe geeigneter Technologien werden die Bindungsvorgänge oder die chemischen Reaktionen gemessen und somit Analyten nachgewiesen.

Der Nachweis von Analyten mittels chemischer Reaktionen wird in der Regel durchgeführt, um eine Erhöhung der Spezifität und/oder Sensitivität zu erreichen. Hierbei werden im Allgemeinen ausgehend vom Analyten über selektive Reaktio-

nen Produkte generiert, die in der Regel empfindlicher als die Analyten selbst nachgewiesen werden können. Bei derartigen Reaktionen werden zur Reaktionsbeschleunigung auch Katalysatoren eingesetzt. Aufgrund ihrer Substratspezifität und ihrer hohen katalytischen Effizienz werden insbesondere Enzyme zu diesen Zwecken verwendet (Bergmeyer 1965; Bisswanger 1994).

Gegebenenfalls wird die analytenspezifische Erzeugung von Reaktionsprodukten auch ausgenutzt, um die Applikation einer bestimmten Detektionstechnologie zu ermöglichen. Beispielsweise kann die Generierung eines chromophoren Reaktionsproduktes mit Absorptionseigenschaften in entsprechenden Wellenlängenbereichen für eine einfache und empfindliche spektrophotometrische Detektion von Vorteil sein.

Werden bei chemischen bzw. biochemischen Reaktionen Katalysatoren eingesetzt, kann die Sensitivität und gegebenenfalls die Spezifität durch folgende Verfahren weiter erhöht werden. Zum Einen können Katalysatoren, vorzugsweise Enzyme, eingesetzt werden, um extrem geringe Konzentrationen eines Analyten selektiv zu vervielfältigen. Erst nach oder während der Amplifikation des Analyten wird dieser spezifisch und sensitiv nachgewiesen. Dies ist beispielsweise bei der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction; PCR) der Fall (Saiki, Scharf et al. 1985; Mullis 1987). Hierbei werden bestimmte Nukleinsäuresequenzen in Gegenwart einer Polymerase, entsprechender „Primer“, Nukleosidtriphosphate und weiterer Cofaktoren mittels thermischer Zyklen amplifiziert. Zum Anderen kann eine Signalamplifikation unter Verwendung entsprechender Katalysatoren durchgeführt werden. Dies erfolgt insbesondere durch Enzymreaktionen, die in Gegenwart eines Analyten Substrate umsetzen. Die Spezifität dieser Verfahren wird beispielsweise durch immunologische Techniken bzw. Tests erreicht.

Diese immunologischen Tests, Enzymimmunoassays (EIAs), werden insbesondere im Life Science Bereich und in der Diagnostik zur Bestimmung geringster Mengen von Analyten in biologischen Proben verwendet. Zu den wichtigsten EIAs gehören der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und die Enzyme-multiplied Immuno-Technique (EMIT).

Bei EMIT handelt es sich um ein homogenes Flüssigphasentestsystem, das hauptsächlich zur Bestimmung von niedermolekularen Substanzen wie diversen Pharmaka, Hormonen oder Metaboliten verwendet wird. Nukleinsäuren werden mit EMIT nicht nachgewiesen. EMIT ist in der Regel schneller als der ELISA, erreicht allerdings im Allgemeinen auch nicht die Sensitivität des ELISAs.

Der ELISA ist ein heterogener Festphasenassay, der überwiegend zum Nachweis von Makromolekülen wie Antigenen und Antikörpern eingesetzt wird. Teilweise werden ELISA-Methoden auch für den Nachweis von Nukleinsäuren verwendet. Dies geschieht jedoch in der Regel nur indirekt über Antigen-markierte Nukleinsäuren. In Allgemeinen erfolgt hier zunächst eine teure und zeitaufwendige Amplifikation der Zielsequenz, beispielsweise über PCR mittels Antigen-markierter Primer. Erst nach einer Hybridisierung des Amplifikationsproduktes an immobilisierten homologen Oligonukleotiden und weiterer Bindungsprozesse, kann der eigentliche enzymatische Test durchgeführt werden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es somit, ein analytisches Testsystem und entsprechendes Verfahren zur Verfügung zu stellen, die insbesondere für eine Vielzahl unterschiedlicher Analyten flexibel einsetzbar und dabei gleichzeitig spezifisch und kostengünstig sind.

Die erfindungsgemäßen analytischen Testsysteme ermöglichen, die Analyten schnell, spezifisch, hochsensitiv und kostengünstig nachzuweisen. Für wissenschaftliche und diagnostische Zwecke ist diese Erfindung somit sehr hilfreich und von großem Interesse.

Neben dem schnellen, spezifischen, hochsensitiven und kostengünstigen Nachweis von Analyten, insbesondere Nukleinsäuren, bietet die Erfindung zudem die Möglichkeit, ein entsprechendes analytisches System sehr flexibel zu gestalten. Erfindungsgemäß können sowohl niedermolekulare als auch hochmolekulare Analyten bestimmt werden. Zudem kann das beschriebene System auf eine Vielzahl katalytischer Systeme zurückgreifen und nicht nur homogen, sondern auch heterogen betrieben werden.

Neue molekulare Schaltersysteme bilden die Grundlage für diese neuen analytischen Systeme. Basis der molekularen Schaltersysteme ist die Kombination einer katalytischen Komponente mit einer Komponente, die als Sonde fungiert. Hierbei wird mindestens eine katalytische Komponente mit mindestens einer Sonde in einer Art und Weise kombiniert, so dass unter ausgewählten Bedingungen, in Gegenwart eines bestimmten Analyten, die katalytische Aktivität des molekularen Schaltersystems beeinflusst und damit verändert wird. Die Veränderung der katalytischen Aktivität kann sich hierbei sowohl auf das Ausmaß der katalytischen Aktivität, als auch auf deren Spezifität beziehen. Die Detektion der veränderten katalytischen Aktivität kann somit zum spezifischen und sensitiven Nachweis eines Analyten eingesetzt werden.

Die katalytische Komponente zeichnet sich dadurch aus, dass sie ein oder mehrere Substrate in ein oder mehrere Produkte umwandelt oder an diesem Prozess beteiligt ist. Zum einen bedeutet dies, dass die katalytische Komponente selbst als Katalysator arbeitet und somit in der Lage ist, die Geschwindigkeit einer Reaktion zu beschleunigen. Da die Hin- und Rückreaktion gleichermaßen beschleunigt werden, verändert der Katalysator die Lage des Gleichgewichtes nicht (Becker, Berger et al. 1993; Bisswanger 1994). Zum anderen kann die katalytische Komponente an einem katalytischen Prozess beteiligt sein, ohne dass diese direkte katalytische Eigenschaften besitzen muss.

Erfindungsgemäß kann als katalytische Komponente jedweder Katalysator eingesetzt werden. Als katalytische Komponenten kommen sowohl anorganische als auch organische Verbindungen mit katalytischer Aktivität in Frage. Insbesondere kommen anorganische und organische Verbindungen in Frage, die als Säuren und/oder Basen fungieren. Vorzugsweise werden Lewis-Säuren bzw. Lewis-Basen eingesetzt. Des Weiteren sind insbesondere anorganische und organische katalytisch aktive Verbindungen einzusetzen, die an der Übertragung von Elektronen beteiligt sind und damit Redoxreaktionen unterstützen.

Beispielsweise können organische Verbindungen wie saure bzw. basische und/oder elektronenübertragende, d.h. redoxaktive Aromaten, Heteroaromaten, organische Komplexe, Proteine, insbesondere Enzyme, aber auch katalytisch ak-



tive Antikörper oder Nukleinsäuren mit katalytischer Aktivität und deren Derivate verwendet werden.

Bei den anorganischen Verbindungen können beispielsweise Metalle, Legierungen, Metalloxide, Übergangsmetallkomplexe und Elektrodensysteme eingesetzt werden. Metalle wie zum Beispiel Eisen, Kobalt, Nickel, Palladium, Platin, Kupfer, Silber, etc. und deren Legierungen, Salze, Oxide, Sulfide, metallorganische Verbindungen und Übergangsmetallkomplexe fungieren im Allgemeinen als katalytische Lewis-Säuren bzw. Lewis-Basen und/oder Elektronenüberträger und können demnach erfindungsgemäß als katalytische Komponente oder deren Bestandteil eingesetzt werden (Becker, Berger et al. 1993).

Die Wahl des optimalen anorganischen Katalysators hängt von der zu katalysierenden Reaktion ab. In einer bevorzugten Ausführungsform können beispielsweise die Übergangsmetallkomplexe Kaliumhexacyanoferrat II oder III bei der Katalyse von Redoxreaktionen, beispielsweise bei der Umsetzung von redoxaktiven Substanzen wie Phenazinmethosulfat (PMS), Benzochinon, etc. vorzugsweise jedoch beispielsweise ein Tetrazoliumsalz bzw. das entsprechende Formazan, eingesetzt werden. Hier können beispielsweise Tetrazoliumsalze wie Nitroblau-Tetrazolium, insbesondere Iodonitrotetrazoliumchlorid verwendet werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden anorganische Verbindungen, insbesondere Metalle, Legierungen und Metalloxide als Elektroden eingesetzt, die als Bestandteil der katalytischen Komponenten oder als katalytische Komponente selbst eingesetzt werden. Hierbei können prinzipiell alle leitfähigen Materialien Verwendung finden. Beispielsweise ist neben dem Einsatz von Metallen, Legierungen und Metalloxiden auch der Einsatz von leitfähigen Kunststoffen oder Keramiken und anderen Verbundwerkstoffen möglich. Bei der Verwendung von Elektroden, die an ein elektrisches Potential angeschlossen sind, handelt es sich nicht unbedingt um einen Katalysator im engeren Sinne. Die Elektroden werden hier lediglich zum Transfer von Ladungsträgern, Elektronen, eingesetzt, die beispielsweise ein Redoxsystem, insbesondere ein „Redoxcycling“ unterstützen. Auch hier hängt die Wahl der optimalen Elektrode von der zu katalysierenden Reaktion ab. In einer bevorzugten Ausführungsform sind insbesondere Metalle wie

Silber, Gold und Platin einzusetzen. Insbesondere Platin ist aufgrund seiner Stabilität vorzuziehen. Silber und Gold sind insbesondere dann einzusetzen, wenn Kopplungsreaktionen mit der Elektrode durchgeführt werden sollen. Hierbei ist vorzugsweise Gold zu verwenden (Hintsche 1999).

Werden organische Verbindungen als Katalysatoren eingesetzt, können beispielsweise katalytisch aktive Nukleinsäuren oder deren Derivate als katalytische Komponente oder als Bestandteil der katalytischen Komponente verwendet werden. Hierbei können Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren und Nukleinsäurederivate eingesetzt werden. Beispielsweise können Nukleinsäuren mit Zuckerderivaten, insbesondere die der Familie der Pentopyranosyl-(2'-4')-Oligonukleotide zum Einsatz kommen (Beier, Reck et al. 1999). Hierbei ist es auch denkbar, Ribosen zu verwenden deren 2'-Sauerstoffatom mit dem 4'-Kohlenstoffatom über eine Methylenbrücke verknüpft ist („Locked Nucleic Acids“) (Kurreck, Wyszko et al. 2002). Veränderungen des Rückgrats der katalytischen Nukleinsäure müssen sich nicht nur auf die verwendeten Zucker beziehen, sondern auch auf die Verknüpfung der Zucker untereinander. Es ist natürlich ebenfalls denkbar, das Zuckerphosphatgerüst komplett durch andere Komponenten zu ersetzen. Dies ist zum Beispiel bei den „Peptide Nucleic Acids“ (Nielsen and Egholm 1999) der Fall. Neben der Verwendung von Nukleinsäuren mit derivatisiertem Rückgrat können auch Nukleinsäuren mit ungewöhnlichen Basen wie Desaminoadenosin, Inosin, etc. oder biotinylierte sowie digoxigenierte Basen und andere Derivate eingesetzt werden.

Abgesehen von Nukleinsäuren kommen auch katalytisch aktive Proteine, wie katalytisch aktive Antikörper und Enzyme, als Bestandteil der oder als katalytische Komponenten in Betracht. Prinzipiell können Enzyme aller Enzym-klassen (Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen) verwendet werden (Bergmeyer 1965). Dies bezieht sich auch auf die enzymatische Aktivität katalytisch aktiver Antikörper oder Nukleinsäuren.

Da sich Oxidoreduktasen für die enzymatische Analyse im Allgemeinen gut eignen, sind diese für die erfindungsgemäße Anwendung von besonderem Interesse. Beispielsweise können Peroxidasen wie die Katalasen, etc. insbesondere jedoch

die Meerrettich-peroxidasen und die NADH-Peroxidasen verwendet werden. Außerdem können Oxidasen wie die Cholesterin-Oxidasen, Sulfit-Oxidasen, etc. insbesondere jedoch die Xanthin-Oxidasen, die Ascorbinsäure-Oxidasen, die Glukose-Oxidasen, die Glutamat-Oxidasen, die Monoamin-Oxidasen A und B, die Semicarbazid-sensitive Amin-Oxidasen, die Cholin-Oxidasen und die Galaktose-Oxidasen eingesetzt werden. Reduktasen wie die Glutathion-Reduktasen können ebenfalls zum Einsatz kommen. Hier seien insbesondere auch redoxaktive Proteine wie Thioredoxin, Glutaredoxin, etc. zu nennen. Insbesondere die Oxidoreduktase Luciferase kann von Interesse sein. Weitere interessante Oxidoreduktasen sind beispielsweise Dehydrogenasen wie die Formiatdehydrogenasen, Glutamatdehydrogenasen, Laktatdehydrogenasen, Alkoholdehydrogenasen, Sorbitdehydrogenasen, Malatdehydrogenasen, Malatenzyme, Isocitrat-Dehydrogenasen, Galactose-Dehydrogenasen, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenasen, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenasen, Dihydroliponamid-Dehydrogenasen und insbesondere die Diaphorasen ebenfalls geeignet. Enzyme wie Diaphorasen mit hoher Stabilität gegenüber denaturierenden Bedingungen wie hohen Temperaturen sind von besonderem Interesse (Vitzthum, Bisswanger et al. 2000).

Bei den Diaphorasen ist die Diaphorase aus *Clostridium kluyveri* wiederum besonders geeignet, da es sich hier um ein Monomer handelt. Monomere haben den Vorteil, dass Konjugate in der Regel leichter hergestellt werden können und weniger Nebenprodukte entstehen.

Ebenfalls von besonderem Interesse können Enzyme wie die Diaphorase aus *Scylliorhinus canicula* sein (Vitzthum, Bisswanger et al. 2000). Bei hohen Temperaturen, z.B. den Denaturierungs- und ggf. Hybridisierungsbedingungen der Sonden und Analyten, ist das Enzym zwar inaktiv aber nicht irreversibel denaturiert. Wird die Temperatur reduziert, wird das Enzym wieder aktiv. Dies hat Vorteile, wenn die Substrate schon zu Beginn des Prozesses vorhanden sind, da die Reaktion erst beim Absenken der Temperatur auf einen bestimmten Wert signifikant in Gang kommt. Eine gewisse Grundaktivität während der Denaturierungs- und Hybridisierungsbedingungen kann somit reduziert werden. Dies wirkt sich positiv auf die Spezifität und Sensitivität des Systems aus.

Bei den Transferasen können beispielsweise Enzyme wie die Phosphotransacetylase, Glucokinasen, Acetatkinasen, Gluconatkinasen, Glycerokinasen, Pyruvat-Kinasen, die Glutamat-Oxalacetat-Transaminasen (GOT), die Glutamat-Pyruvat-Transaminasen (GPT), etc., insbesondere jedoch die Hexokinasen verwendet werden. Enzyme wie Hexokinasen bieten den Vorteil, dass größere strukturelle Veränderungen beim Umsatz der Substrate erfolgen, so dass der Einfluss von Analyten auf die Aktivität eines molekularen Schalters mit entsprechenden Enzymen unerwartet groß sein kann. Bei den Hexokinasen basiert die strukturelle Veränderung auf einem sogenannten „induced-fit“.

Bei den Hydrolasen können beispielsweise Enzyme wie die Ureasen (Uricase), Amylasen (Amyloglucosidasen), Lactasen,  $\beta$ -Fructosidasen (Invertasen, Saccharasen), Maltasen,  $\beta$ -Galaktosidasen, Maltosephosphorylase, Pyrophosphatase, Muramidase (Lysozyme), Neuramidase (Sialidasen), PNGaseF, Endoglycosidase (Endo- $\alpha$ -N-acetylgalactosamidase) D, Endoglycosidase F, Endoglycosidase H, Acetylcholinesterasen, Collagenasen, Gelatinasen, Sphingomyelinase, etc. eingesetzt werden. Ebenfalls von Interesse sind Lipasen, insbesondere Phospholipasen (Phospholipasen C und D, sowie Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C). Auch Phosphatasen, insbesondere jedoch die alkalischen und die sauren Phosphatasen sowie die Serin/Threonin Phosphatasen (PP2A, PP1, PP-2B, etc.) und die Tyrosin Phosphatasen (CD-45, PTP-1B, LAR, etc.) können eingesetzt werden. Insbesondere seien hier die prostatiche saure Phosphatase und die Proteinphosphatase 1 zu nennen. Des Weiteren können Proteasen wie Metalloproteasen, Serinproteasen, Saure Proteasen und Cysteinproteasen verwendet werden. Hier sind insbesondere Thermolysin, Chymotrypsine, Trypsine, Proteinase K, Caspasen, Elastasen, Papaine, Pepsine, und Cathepsine einsetzbar.

Bei den Lyasen können beispielsweise die Citratlyasen bzw. Citratsynthasen und die Oxalat-Decarboxylase, etc. verwendet werden.

Bei den Isomerasen können zum Beispiel die Phosphoglucose-Isomerasen und die Mutarotasen (Aldolase 1-Epimerasen), etc. eingesetzt werden.



Beispiele für relevante Ligasen sind Acetyl-CoA-Synthetasen, NAD-Synthasen, Glutamat-Cystein-Ligasen, Homoglutathion-Synthasen, etc.

Neben den Enzymen können auch niedermolekulare organische Verbindungen, insbesondere redoxaktive Substanzen beispielsweise Aromaten oder Heteroaromaten wie Benochinon, Phenazinmethosulfat (PMS), 2,6 Dichlorphenolindophenol (DCPIP), Methylviologen, Flavinmononukleotid (FMN), Flavin-Adenin-Dinukleotid, Liponsäure, Ascorbinsäure, Tocopherole, Resorufin, Resazurin, Porphyrine, Hämverbindungen, Biliverdin, Bilirubin als Katalysatoren eingesetzt werden. Als Sonden werden bevorzugt Nukleinsäuren wie Ribonukleinsäuren und Desoxyribonukleinsäuren und deren Derivate wie z.B. „Peptide Nucleic Acids“ oder „Locked Nucleic Acids“ eingesetzt. Neben dem Einsatz von Nukleinsäuren mit derivatisiertem Rückgrat, können natürlich auch hier Nukleinsäuren mit ungewöhnlichen Basen (siehe oben) eingesetzt werden. Vorzugsweise handelt es sich bei den Nukleinsäuresonden um Oligonukleotide. Die Sonden liegen prinzipiell in zwei Formen vor, in einer hybridisierten und einer nicht-hybridisierten Form. Bei der hybridisierten Form kann es sich beispielsweise um eine der Doppelhelixstrukturen, aber auch um eine Tripelhelix oder um eine quadruplexe Struktur handeln (Rosu, Gabelica et al. 2002). Die hybridisierte Struktur basiert entweder auf der intermolekularen Hybridisierung zweier nicht kovalent miteinander verbundener homologer Nukleinsäureeinzelstränge oder auf der intramolekularen Hybridisierung eines einzigen Nukleinsäurestranges aufgrund intramolekularer homologer Bereiche, die die Bildung einer Sekundärstruktur erlauben.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst oder beinhaltet die Nukleinsäuresonde eine oder mehrere Kopplungsgruppen und oder Bindungskomponenten, d.h. ein Partner aus einem Bindungspartnersystem. Diese Strukturen können durch Konjugation über jedwede Komponente der Nukleinsäure, d.h. Base, Rückgrat, Zucker- oder Phosphatgruppe, eingeführt werden. Sie können im Bereich des 3'- oder 5'-Endes aber auch im mittleren Bereich der Sonde integriert werden.

Prinzipiell sind hier Kopplungskomponenten von Bindungskomponenten bzw. Bindungspartnersystemen zu unterscheiden. Kopplungskomponenten dienen zur Kombination verschiedener Komponenten und führen zu einer permanenten, nicht

kovalenten oder kovalenten Verbindung, d.h. zur Konjugation; Kombination oder Verbindung verschiedener Komponenten. Kopplungskomponenten liefern eine stabile Konjugation von Komponenten, zumindest unter den Versuchs- bzw. Prozessbedingungen. Genauer, das Gleichgewicht von freien und gebundenen Kopplungskomponenten verschiebt sich innerhalb der Versuchs- bzw. Prozessbedingungen kaum und ist von den Versuchs- bzw. Prozessbedingungen nur sehr geringfügig abhängig. Bei extremen Bedingungen, die für die Durchführung von Versuchen mit diesem Testsystem meist nicht relevant sind, wie zum Beispiel sehr hohen oder niedrigen pH-Werten, sehr hohen oder sehr niedrigen Ionenstärken, sehr hohen Temperaturen, müssen die Bindungen dieser Kopplungskomponenten nicht mehr unbedingt stabil sein.

Bindungspartnersysteme verfügen hingegen unter den bevorzugten Versuchs- bzw. Prozessbedingungen über eine höhere Bindungsreversibilität. Das heißt eine bestehende Bindung kann in Gegenwart eines Analyten und/oder bei der Änderung von Parametern wie Temperatur und/oder Lösungsmittelzusammensetzung getrennt werden oder eine nicht vorhandene Bindung wird ermöglicht. Genauer, das Gleichgewicht von freien und gebundenen Bindungspartnern verschiebt sich innerhalb der Versuchs- bzw. Prozessbedingungen und ist von diesen abhängig. Sie sind damit für die reversible Bindung von Sonden-Komponenten, katalytischen Komponenten und Analyten geeignet. Diese Bindungspartnersysteme können insbesondere dann eingesetzt werden, wenn neben Nukleinsäuren auch andere Analyten nachzuweisen sind.

Bei den Bindungspartnern kann es sich um Makromoleküle oder bestimmte Domänen von Makromolekülen handeln, die eine Affinität gegenüber bestimmten Liganden aufweisen. Beispielsweise können Rezeptoren, Enzyme, Antikörper oder deren Bindungsdomänen, Affibodies® sowie Aptamere, Aptamerstrukturen bzw. Aptamersequenzen und insbesondere Photoaptamere (Smith, Collins et al. 2003), eingesetzt werden.

Photoaptamere, prinzipiell aber auch jedwede andere Sonde, die mit mindestens einer photoreaktiven Gruppe ausgestattet ist, bieten beispielsweise den Vorteil, – dass der nicht kovalent gebundene Analyt durch eine Photoreaktion kovalent mit

der Sonde verbunden wird. Dies erlaubt insbesondere bei heterogenen Testsystemen ein stringentes Waschen, so dass unspezifische Bindungen reduziert werden. Dies führt letzten Endes zu einer höheren Sensitivität.

Hierbei ist es insbesondere von Vorteil, wenn der molekulare Schalter an einer Festphase, beispielsweise an Partikeln, insbesondere magnetische Partikel, oder an der Oberfläche eines Reaktionsgefäßes wie einer Mikrotiterplatte, gebunden ist. Die Trennung der Festphase von der flüssigen Phase erlaubt die Durchführung effizienter Waschschriffe.

Neben Affibodies® können auch andere Antikörper-ähnliche Moleküle und deren Derivate wie „Designed Repeat Proteins“ (Forrer, Stumpp et al. 2003) und Antikörper-ähnliche „Protein Scaffolds“ wie „Anticaline“ bzw. „Duocaline“ (Skerra 2000; Skerra 2001) eingesetzt werden. „Designed Repeat Proteins“ bzw. „Protein Scaffold“ können beispielsweise aus Ankyrinen oder „Leucin-rich Repeats“ hergestellt werden. „Anticaline“ bzw. „Duocaline“ sind entsprechend veränderte Lipocaline. Es ist ebenfalls denkbar, dass Liganden wie Antigene, Substrate, Cosubstrate, Inhibitoren, prothetische Gruppen, etc. als affine Strukturelemente in die Sonde eingebracht werden. Die jeweiligen Strukturelemente bzw. Komponenten der Sonden werden entsprechend miteinander konjugiert.

Die Bindungskomponenten bzw. Bindungspartner sind an der Bindung eines Analyten beteiligt. Im Gegensatz hierzu dienen die Kopplungskomponenten zur stabilen Verbindung der verschiedenen Komponenten eines molekularen Schalters. Die durch die Kopplungskomponenten hergestellte Verbindung, d.h. chemische Bindung bzw. Konjugation, kann sowohl kovalent als auch nicht-kovalent sein. Erfindungsgemäß können hierbei sämtliche Möglichkeiten kovalenter und nicht-kovalenter Bindungen eingesetzt werden.

Als kovalente Bindungen kommen unter anderem Bindungen über Methylen, Methine, Ether, Thioether, Carbonsäureester, Amide, Amine, Schiff'sche Basen bzw. Azomethine, Enamine usw. in Betracht. Vorzugsweise werden Verbindungen aufgebaut, die über die gängigen Kopplungsreaktionen einfach, schnell und kostengünstig erhalten werden (Becker, Berger et al. 1993). Hierbei können reaktive

Gruppen der Komponenten direkt miteinander oder über Kopplungskomponenten, Vernetzer, gegebenenfalls auch über Bindungspartner wie Avidin und Biotin, gekoppelt werden. Vernetzer mit entsprechenden funktionellen Gruppen wie Aldehyde, Imidate, insbesondere Imidoester, Carbonsäureanhydride, Carbodiimide, Succinimidester, insbesondere N-Hydroxysuccinimidester, Maleimide, Haloacetylene, Pyridyldisulfide, Hydrazide, Isocyanate, Glyoxale, etc. oder photoaktivierbare funktionelle Gruppen wie Arylazide können hierzu eingesetzt werden. Sowohl homofunktionelle Vernetzer wie Glutardialdehyd und Dimethylsuberimidat als auch heterofunktionelle Vernetzer, die verschiedene funktionelle Gruppen besitzen, können Verwendung finden (Pierce Katalog) (Becker, Berger et al. 1993; Rehm 2002). Weitere chemische Modifikationen der kovalenten Bindung zwischen der katalytischen Komponente und der Sonden-Komponente sind ebenfalls denkbar. Bindungen über Schiff'sche Basen können zum Beispiel zu stabileren Aminen reduziert werden (Becker, Berger et al. 1993).

Die nicht-kovalenten Bindungen können auf Van der Waals Kräften, auf hydrophoben und ionischen Wechselwirkungen sowie auf Wasserstoff-Brücken und koordinativen Bindungen beruhen. Erfindungsgemäß können daher z.B. Metallchelatekomplexe wie Nickel-Histidin-Chelate und andere verwendet werden. Außerdem kann auch die nicht-kovalente Bindung von Liganden an Makromoleküle, wie die von Biotin an Avidin oder Streptavidin sowie die von Digoxigenin an entsprechenden Antikörpern, eingesetzt werden. Des Weiteren ist es denkbar, die Sonde mit einem Enzymsubstrat bzw. Enzymcosubstrat, einem Cofaktor oder einer prosthetischen Gruppe zu versehen und diese hierdurch an ein Enzym zu binden, das als katalytische Komponente fungiert.

Daneben ist auch der Einsatz von Wechselwirkungen ausschließlich niedermolekularer Substanzen denkbar. Hierbei sei beispielsweise auf die Komplexbildung verschiedener Substanzen, vorzugsweise Salicylhydroxamsäure durch 1,2-Phenyldiboronsäure verwiesen (Stolowitz, Li et al. 2002).

Des Weiteren können zur Kopplung von Sonde und katalytischer Komponente auch biotechnologisch veränderte Proteine bzw. Enzyme verwendet werden. Hier kommen Fusionskonstrukte entsprechender Expressionssysteme beispielsweise



mit „Tags“ wie Protein Kinase A, Thioredoxin, Cellulose Binding Domain, His, Dsb, Glutathione-S-Transferase, NusA, etc. in Frage. Außerdem können auch durch gerichtete (Molecular Modelling) oder zufällige Mutagenese veränderte Proteine verwendet werden. Durch Mutagenese veränderte Proteine haben hierbei den Vorteil, dass funktionelle Gruppen an bestimmten Stellen eingeführt werden können, so dass eine optimale Verknüpfung der Komponenten möglich ist. Im Gegensatz zu in vivo Translationssystemen sind hier gegebenenfalls vorzugsweise zellfreie in vitro Translationssysteme einzusetzen, da hier an bestimmten Stellen unnatürliche Aminosäuren eingeführt werden können, die ganz spezifische Koppelungsreaktionen ermöglichen.

Im Folgenden wird das erfindungsgemäße analytische Verfahren näher beschrieben:

Mittels entsprechender Verfahren werden die neuen molekularen Schalter für analytische Zwecke einsetzbar. Bei den Verfahren wird mindestens ein molekularer Schalter mit einer zu analysierenden Probe in Verbindung gebracht. Durch geeignete Wahl der Versuchsbedingungen, wie Temperatur und/oder die Zusammensetzung des Lösungsmittels bindet ein Analyt (die nachzuweisende Substanz), der gegebenenfalls in der Probe vorhanden ist, spezifisch an die Sonden-Komponente des molekularen Schalters. Dieser Bindungsvorgang verändert die Konformation der Sonde und damit auch die Struktur und katalytische Aktivität der katalytischen Komponente sowie letzten Endes des molekularen Schalters. Da die entscheidenden Konformationsänderungen der Sonde auf dem Hybridisierungszustand der Nukleinsäurekomponenten basieren, sind entsprechende Temperatur- und Lösungsmittelparameter zu wählen, um optimale Hybridisierungsvorgänge zu ermöglichen.

Prinzipiell sind mindestens drei verschiedene Szenarien denkbar. Erstens, bei gleichbleibender Zusammensetzung des Mediums bzw. des Lösungsmittels und der Temperatur kann die Gegenwart des Analyten zu dessen Bindung an der Sonde führen. Zweitens, bei gleichbleibender Zusammensetzung des Mediums bzw. des Lösungsmittels kann mindestens eine Temperaturveränderung die Stabilität und/oder Konformation der Sonde ändern, so dass ein Analyt an der Sonde gebunden werden kann. Drittens, bei gleichbleibender Temperatur kann mindes-

tens eine Änderung der Zusammensetzung des Mediums bzw. des Lösungsmittels die Stabilität und/oder Konformation der Sonde so ändern, dass ein Analyt an der Sonde gebunden werden kann. Prinzipiell ist es möglich die Szenarien zu kombinieren. Das Ergebnis der Szenarien ist die Bindung des Analyten an die Sonde und damit eine Konformationsänderung der Sonde, so dass eine messbare Änderung der Aktivität des molekularen Schalters auftritt. Bei der Verwendung von Temperaturänderungen ist es beispielsweise möglich, über eine kontinuierliche oder schrittweise Erhöhung der Temperatur miteinander hybridisierte Sondenbereiche aufzuschmelzen. Umgekehrt kann durch kontinuierliche oder schrittweise Erniedrigung der Temperatur eine Reassoziaton homologer Sondenbereiche erfolgen. Dabei verändert die Gegenwart eines Analyten den Schmelzvorgang aber auch insbesondere die Reassoziaton homologer Sondenbereiche, was letzten Endes zur Aktivitätsänderung des molekularen Schalters und zur Detektion des Analyten führt.

Die Temperaturabhängigkeit des Aufschmelzen und der Reassoziaton homologer Sondenbereiche ist wiederum abhängig vom Lösungsmittel, insbesondere vom Vorhandenseins bestimmter Salze und organischer Komponenten sowie deren Konzentrationen, der Zusammensetzung der Sonde, insbesondere der Nukleinsäurebasenzusammensetzung und der Länge der homologen Bereiche. Unter kinetischen Aspekten muss außerdem die Konzentration der Sonden und damit der molekularen Schalter sowie gegebenenfalls der vorhandenen Analyten berücksichtigt werden. Da kinetische Aspekte ebenfalls eine Rolle bei Hybridisierungsvorgängen spielen, kann durch entsprechende Wahl von Inkubationszeiten ebenfalls Einfluss auf den Prozess genommen werden.

Kinetische Aspekte sind bei den Hybridisierungsvorgängen auch vor allem deshalb entscheidend, weil das Aufschmelzen einer doppelsträngigen Nukleinsäure nach einer Reaktion 1. Ordnung erfolgt, die Assoziaton oder Reassoziaton hingegen durch eine Reaktion 2. Ordnung beschrieben wird (Smith, Britten et al. 1975; Galau, Britten et al. 1977; Torsvik, Goksoyr et al. 1990; Torsvik, Daae et al. 1998). Somit erfolgt das Aufschmelzen einer Doppelstrang-Sonde beispielsweise

nach

$$d[\text{Einzelstrang-Sonde}]/dt = k_1 [\text{Doppelstrang-Sonde}] \quad (1)$$

nur in Abhängigkeit der Konzentration der intramolekularen Doppelstrang-Sonde und der Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung  $k_1$ .

Im Gegensatz hierzu erfolgt die Assoziation einer nicht hybridisierten Sonde mit einer einzelsträngigen Nukleinsäure, dem Analyt, zum Sonde/Analyt-Komplex (Sonde x Analyt) nach

$$d[\text{Sonde x Analyt}]/dt = k_2 [\text{Einzelstrang-Sonde}] [\text{Einzelstrang-Analyt}] \quad (2).$$

Sowohl die Konzentration der Einzelstrang-Sonde wie auch die Konzentration des Einzelstrang-Analyten haben einen Einfluss auf die zeitabhängige Generierung bzw. Konzentration von Sonde/Analyt-Komplexen.

Die Geschwindigkeitskonstanten müssen empirisch ermittelt werden und sind von den Reaktionsbedingungen wie der Temperatur, dem Lösungsmittel, etc. abhängig. Da die Aktivität des molekularen Schalters von der Konzentration des Sonde/Analyt-Komplexes, die Zeitabhängigkeit der Bildung dieses Komplexes und ggf. das Erreichen eines Gleichgewichtes jedoch von zahlreichen Parametern wie der Temperatur, dem Lösungsmittel, der Konzentration der Sonde, der Konzentration des Analyten, etc. abhängig sind, kann keine allgemein gültige Verfahrensangabe gegeben werden. Diese ist vom jeweiligen System abhängig. Es wird eben aber auch deutlich, dass über die Inkubationszeit der Prozess bzw. die jeweiligen Teilprozesse beeinflusst bzw. gesteuert werden können.

Neben der kontinuierlichen Erhöhung bzw. Erniedrigung der Prozesstemperatur wird die Temperaturveränderung beim Analysevorgang vorzugsweise in diskreten Schritten vorgenommen. Beispielsweise wird von einer bestimmten Anfangstemperatur ausgehend die Temperatur möglichst rasch erhöht, so dass die entsprechenden Sondenbereiche und gegebenenfalls auch die Analyten in der „aufgeschmolzenen“ also der Einzelstrang-Konformation vorliegen. In einem weiteren

Schritt wird dann die Temperatur möglichst schnell auf eine Hybridisierungstemperatur reduziert. Hierbei erfolgt die Assoziation bzw. Reassoziationshomologer Bereiche. Gegebenenfalls kann bei dieser Temperatur auch die Aktivitätsbestimmung der katalytischen Komponente stattfinden. Es ist auch denkbar, die Temperatur zur Aktivitätsbestimmung nochmals zu erniedrigen oder zu erhöhen. Hierbei muss die Temperatur allerdings unter dem Bereich der Temperatur des Aufschmelzprozesses liegen.

Prinzipiell kann der Prozess des Aufschmelzens und der Reassoziationshomologer Bereiche auch durch die Veränderung des Lösungsmittels gesteuert bzw. die thermischen Prozessschritte hierdurch unterstützt werden. Beispielsweise kann durch die Zugabe bestimmter Mengen mindestens eines organischen Lösungsmittels, einer Säure oder einer Base sowie eines Hilfstoffes, die Schmelztemperatur verändert, beispielsweise erniedrigt, werden. Durch entsprechendes Verdünnen mit Wasser kann die Schmelztemperatur wieder erhöht werden. Ähnlich kann die Änderung der Ionenstärke, beispielsweise durch Verdünnen mit Wasser oder durch die Zugabe von Salzen, ausgenutzt werden. Hierbei führt die Erhöhung der Ionenstärke überwiegend zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur.

Vor, während und nach Hybridisierungsvorgängen können demnach verschiedene Temperaturen und/oder Lösungsmittelzusammensetzungen eingestellt werden, um entsprechende Strukturveränderungen auszulösen und/oder, um eine entsprechende katalytische Aktivität zu erhalten. Bevorzugt besteht das Lösungsmittel hierbei aus Wasser und/oder organischen Lösungsmitteln und kann außerdem als weitere Komponenten Puffer, Salze, Substrate, Cosubstrate, Cofaktoren, Inhibitoren der katalytischen Komponente, zusätzliche Katalysatoren, insbesondere Enzyme, und Hilfstoffe beinhalten. In einer besonderen Ausführungsform ist ebenfalls vorgesehen, zugleich verschiedene Substrate unterschiedlicher Größe und/oder Affinität einzusetzen. Dies kann sich auch auf die Cosubstrate, Cofaktoren und Inhibitoren beziehen. Die jeweiligen Komponenten können alle schon zu Beginn des Prozesses im Lösungsmittel vorliegen oder sukzessive bei diskreten Prozessschritten zugegeben werden.



Bei Systemen, die zunächst katalytisch aktiv sind und durch die Anwesenheit eines Analyten inaktiv werden bzw. ihre Spezifität ändern, kann es von Vorteil sein, die eigentliche Reaktion nach Beendigung der Hybridisierungsvorgänge zu starten. Dies kann durch die Zugabe mindestens eines noch fehlenden Reaktanten erfolgen. Hierbei kann es sich beispielsweise um ein Substrat, Cosubstrat oder Cofaktor handeln.

Als organische Lösungsmittel kommen beispielsweise Aceton, Methanol, Ethanol, Isopropanol, Acetonitril, etc. und insbesondere Dimethylsulfoxid sowie Formamid in Frage. Es können die üblichen Puffer in verschiedenen Konzentrationen und auch Kombinationen verwendet werden, um den pH-Wert in einem bestimmten Bereich stabil zu halten. Beispiele hierfür sind Citrat-, Phosphat-, vorzugsweise jedoch Tris(hydroxymethyl)aminomethanolösungen.

Neben den Puffersubstanzen beeinflussen natürlich auch Salze, der Salztyp und die Salzkonzentration, das System. Alkali- und Erdalkalisalze wie zum Beispiel Natriumchlorid und Magnesiumchlorid werden bevorzugt bei den Hybridisierungsreaktionen eingesetzt. Der Einsatz von moderaten Konzentrationen an Chaotropen wie Guanidiniumsalze (Guanidiniumchlorid, Guanidiniumhydrochlorid, Guanidiniumthiocyanat, Guanidiniumisothiocyanat, Guanidiniumdodecylsulfat, etc.) oder Harnstoff ist ebenfalls denkbar. Gegebenenfalls sind die Salze auch notwendig um eine Katalyse zu ermöglichen. Magnesiumsalze oder andere bivalente Kationen sind unter Umständen für den enzymatischen Umsatz von Substraten notwendig. Letztere, sowie deren Cosubstrate und Cofaktoren können natürlich auch im Lösungsmittel enthalten sein.

Neben den Substraten, Cosubstraten und Cofaktoren der eigentlichen katalytischen Komponente des molekularen Schalters, können derartige Substanzen auch für weitere Katalysatoren vorhanden sein. Zusätzliche Katalysatoren, insbesondere Enzyme, können bei der Durchführung von gekoppelten Tests, beispielsweise durch ein Redoxcycling eingesetzt werden (Bergmeyer 1965; Bisswanger 1994).

Hilfsstoffe wie redoxaktive Substanzen, beispielsweise Dithiothreitol, Glutathion, Thiocysäure und  $\beta$ -Mercaptoethanol können ebenfalls eingesetzt werden, um die Komponenten oder Reaktionsabläufe zu stabilisieren. Der Zusatz von Proteinen wie Albuminen, beispielsweise Rinderserumalbumin, kann einzelne Prozessschritte ebenfalls vorteilhaft beeinflussen. Ectoine (Rehm 2002), die die Struktur von Proteinen insbesondere gegenüber Hitze stabilisieren, können ebenso eingesetzt werden, um die Denaturierung von Proteinen bei höheren Prozesstemperaturen zu verhindern bzw. zu reduzieren.

Hilfsstoffe können aber auch Verbindungen sein, die in besonderer Weise mit den Nukleinsäuren der Sondenkomponente des Schalters Wechselwirkungen und damit einen Einfluss auf die Struktur und das Hybridisierungsverhalten der Sonde bzw. des Analyten haben. Beispiele hierfür sind Cyaninfarbstoffe, Phenanthridine, Acridine, Indole, Imidazole, Actinomycine, Hydroxystilbamidine (Haugland 2002) aber auch Ornithine und Spermidine.

Die oben aufgeführten Einflüsse auf die Konformation der Sonde und die Bindung des Analyten sind komplex. Daher müssen die optimalen Bedingungen für den jeweiligen Einzelfall bestimmt werden. Eine nähere Beschreibung der oben aufgeführten Einflüsse und der damit einhergehenden Verfahrens Anpassungen insbesondere bezüglich des Lösungsmittels und der Temperatur ist im Folgenden ausgeführt.

Bei Hybridisierungsvorgängen von Nukleinsäuren und deren Derivaten handelt es sich i.d.R. um einen reversiblen Prozess, der von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird. Unter anderem ist dies der prozentuale Gehalt der Basen Guanin und Cytosin (%GC), die Länge der Nukleinsäure ( $n$ ), die Konzentration monovalenter Kationen wie Natrium und Agenzien, die einen Einfluss auf die Stabilität des Nukleinsäureeinzelstranges bzw. des Nukleinsäuredoppelstranges wie Formamid, DMSO, etc. haben. Miteinander stehen diese Faktoren nach einer empirisch für DNA ermittelten Formel in Zusammenhang (Meinkoth and Wahl 1984). Mittels dieser Formel lässt sich die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) eines Doppelstranges berechnen:

$$T_m = 81,5 \text{ °C} + 0,41 (\% \text{ GC}) + 16,6 \log [\text{Na}^+] - 500/n - 0,61 (\% \text{ Formamid}) \quad (3)$$

In Anlehnung an (1) kann die auf Howly et al. (Howley, Israel et al. 1979) zurückgehende Formel ebenfalls berücksichtigt werden. Hier wird der Mismatch-Anteil ebenfalls berücksichtigt:

$$T_m = 81,5 \text{ °C} + 0,41 (\% \text{ GC}) + 16,6 \log [M^+] - 500/n - 0,61 (\% \text{ F}) - 1,2 D \quad (4)$$

mit %GC = Prozentualer Anteil an G/C-Paaren,  $[M^+]$  = Konzentration an monovalenten Kationen,  $n$  = Anzahl der Nucleotide, %F = Prozentualer Anteil von Formamid im Puffer

D = Prozentualer Mismatch-Anteil.

In der praktischen Anwendung im Laufe der letzten Jahre hat sich allerdings gezeigt, dass die nach diesen Formeln berechnete Schmelztemperatur nicht als absolut anzusehen ist, sondern nur einen geeigneten Anhaltspunkt liefert. Vermutlich verhalten sich DNA-Doppelstränge *in situ* nicht so wie in Lösung (Leitch and Heslop-Harrison 1994). Nach Britten und Kohne (Britten and Kohne 1968) lässt sich aus der mit (3) errechneten Schmelztemperatur die optimale Hybridisierungstemperatur bzw. Prozesstemperatur wie folgt berechnen:

$$T_h = T_m - 25 \text{ °C} \quad (5)$$

Des Weiteren kann insbesondere bei verhältnismäßig kurzen Oligonucleotiden wie Primern die Wallace-Regel herangezogen werden:

$$T_m = 2 \text{ °C} \times (A + T) + 4 \text{ °C} \times (C + G) \quad (6)$$

Hier wird deutlich, dass der  $T_m$ -Wert von Länge und Sequenz des Oligonucleotids abhängt. Diese Regel wurde allerdings insbesondere für Hybridisierungen an membrangebundenen Oligonucleotiden erstellt und legt eine Salzkonzentration von 1 M zu Grunde. Für Lösungsexperimente sollten zu der errechneten Temperatur 8 Grad Celsius hinzu addiert werden.

Außerdem steht das Nearest-Neighbor-Verfahren zur Verfügung. Es berücksichtigt bei der Berechnung der  $T_m$ -Werte auch die sequenzabhängigen Stackingeffekte und basiert auf den thermodynamischen Daten benachbarter Nucleotidpaare. Dieses Verfahren liefert für Oligonucleotide mittlerer Länge (20 – 60 Basen) verlässliche Werte:

$$T_m = [(1000 \times dH) / (A + dS + R \times \ln (C/4))] - 273.15 + 16,6 \times \log c(K^+) \quad (5),$$

mit  $dH$  = Summe der Enthalpien der Paare,  $dS$  = Summe der Entropien der Paare,  $A = -10.8$  cal, Entropie der Helixbildung,  $R = 1.984$  cal/grad  $\times$  mol, Gaskonstante,  $C$  = Oligonucleotidkonzentration (250 pmol/l),  $c(K^+)$  = Konzentration der Kaliumionen in der Oligolösung (50 mmol/l).

Zusammenfassend kann der Einfluss der Temperatur und des Lösungsmittels beispielsweise auch durch

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\%GC) + 16,6 \log c(M^+) + x \log c(M^{++}) + n \log c(M^n) - 500/n - 0,61 (\%F) - d (\% \text{ Hilfsstoff}) - 1,2 D \quad (2),$$

in Anlehnung an (1) und (2) beschrieben werden. Hierbei sind noch die Einflüsse weiterer Ionen ( $M^{++}$ ;  $M^n$ ) mit verschiedenen Wertigkeiten berücksichtigt. Außerdem sind noch Hilfsstoffe wie oben beschrieben, das heißt weitere organische Lösungsmittel und andere Additive berücksichtigt. Gegebenenfalls können die Einflüsse verschiedener Ionen, beispielsweise über die Ionenstärke, auch in einem Term zusammengefasst werden. Entsprechend kann mit Formamid und anderen Additiven verfahren werden.

Im Folgenden wird die Detektion des Analyten mit Hilfe des erfindungsgemäßen Analysesystems näher beschrieben:

Das Ausmaß der katalytischen Aktivität und Spezifität (bzw. deren Änderung) der molekularen Schalter ist mittels verschiedener Detektionsverfahren meßbar, so dass die Gegenwart (qualitativ) und die Konzentration (quantitativ) eines Analyten bestimmt werden kann. Das auf dem molekularen Schalter basierende analytische



Testsystem kann flexibel eingesetzt werden. Im Grunde ermöglicht der molekulare Schalter die Registrierung eines Bindungsereignisses. Die Art der Registrierung ist hierbei davon abhängig, welche Art von Reaktion stattfindet.

Da energetische Änderungen bei annähernd allen beschriebenen Vorgängen auftreten, beispielsweise bei Enzymreaktionen, kann prinzipiell die Calorimetrie bzw. Microcalorimetrie unter Verwendung von Calorimetern mit den hierfür vorgesehenen Reaktionsgefäßen eingesetzt werden. Ändern sich spektrale Eigenschaften der Lösung, beispielsweise durch Beteiligung von lumineszierenden, insbesondere fluoreszierenden, und absorbierenden Verbindungen, im Besonderen bei enzymkatalysierten Reaktionen, können optische Messungen durchgeführt werden. Optische Messungen beinhalten hier Luminometrie, Fluorimetrie, Photometrie, Polarimetrie, Polarometrie, etc. unter Verwendung der entsprechenden Geräte und Reaktionsgefäße. Prinzipiell kann auch visuell detektiert werden, d.h. zum Beispiel beim Einsatz von Teststreifen, einfachen Küvetten oder Mikrotitrationsplatten, etc. Radiometrische Verfahren sind ebenfalls denkbar, wenn bei Reaktionen Radionukleotide eingesetzt werden. Darüber hinaus können auch Verfahren wie die Manometrie eingesetzt werden, die Druckunterschiede registrieren. Dies ist dann von Interesse, wenn osmotische Prozesse ablaufen, aber auch wenn die Bildung oder der Verbrauch von Gasen, beispielsweise beim Einsatz von Decarboxylasen, erfolgt. Bei elektrochemischen Prozessen unter Verwendung von Elektroden sind amperometrische Verfahren und entsprechende Apparaturen, wie sie beispielsweise bei der Polarographie verwendet werden, einzusetzen. Dies schließt auch die Bestimmung von Potentialdifferenzen, Strömen, Impedanzen, etc. und deren Änderung mit ein.

In Abhängigkeit der durchgeführten Reaktion und des damit verbundenen Detektionsverfahrens sowie Analysators sind entsprechende Reaktionsgefäße wie Küvetten, Mikrotiterplatten, Filterstreifen, aber auch „Arrays“, „Chips“, „beads“, etc. einzusetzen.

Bei den spektrophotometrischen Verfahren können sowohl Absorptionsmessungen als auch luminometrische Messungen eingesetzt werden. Absorptionsmessungen umfassen beispielsweise den Nachweis von Chromophoren und die Be-

stimmung von Trübungen. Letzteres kann auch mittels Streu- oder Reflektionslichtmessungen erfolgen. Bei luminometrischen Messungen stehen beispielsweise Fluoreszenz-, Phosphoreszenz-, Chemolumineszenz- und Biolumineszenzmessungen zur Verfügung.

Elektrische Messverfahren können erfindungsgemäß bei bestimmten Redoxprozessen eingesetzt werden. Die Bestimmung des Stromflusses, der Spannung oder auch des Widerstandes, gegebenenfalls auch des frequenzabhängigen Widerstandes (Impedanz), bieten sich gleichermaßen an.

Generell sind sowohl kinetische Messungen als auch Endpunktsbestimmungen denkbar. Bei spektrophotometrischen Messungen können jeweils in Abhängigkeit des verwendeten Systems einzelne Wellenlängen als auch Spektren aufgezeichnet werden.

Von besonderem Interesse können Detektionssysteme sein, die gekoppelte Tests verwenden. Die Reaktion der katalytischen Komponente kann mit einer weiteren gekoppelt werden, um die Detektion zu erleichtern und gegebenenfalls die Sensitivität zu erhöhen. Insbesondere das Redoxcycling kann hier interessant sein. Beispielsweise kann die pyridindinukleotidabhängige Reaktion einer katalytischen Komponente durch die Regeneration des entsprechenden Pyridindinukleotids mit Hilfe eines ausgewählten Enzyms, einer Dehydrogenase (Formiat-Dehydrogenase, Diaphorase, etc.), unterstützt werden. Gegebenenfalls kann auch das zusätzlich eingeführte Enzym die eigentliche Nachweisreaktion katalysieren. Es ist ebenfalls denkbar weitere Enzyme in diesen Prozess zu integrieren.

Werden Elektroden als katalytische Komponente oder Teil der katalytischen Komponente des molekularen Schalters oder zusätzliche Komponenten im System integriert kann auch ein elektrisch unterstütztes Redoxcycling ausgenutzt werden, das gegebenenfalls auch zur elektrischen Detektion verwendet werden kann. Beispielsweise kann p-Aminophenolgalaktose (als Analyt) durch  $\beta$ -Galaktosidase (als katalytische Komponente) gespalten werden und das entstandene p-Aminophenol kann dann über eine Anode zum Quinonimin oxidiert werden. Die Reduktion des Quinonimin an einer Kathode liefert wiederum p-Aminophenol, so dass über meh-

rere Zyklen eine empfindliche elektrische Detektion erfolgen kann. Außerdem kann die elektrochemische Detektion beispielsweise über den Wasserstoffperoxid-abhängigen Umsatz von Hydrochinon in Benzochinon mittels einer Peroxidase (Meerrettichperoxidase) erfolgen. Unter Verbrauch von Protonen wird Hydrochinon an einer Kathode aus Benzochinon regeneriert.

Im Folgenden werden die Grundlagen für die Änderung der katalytischen Aktivität beschrieben:

Eine mögliche Grundlage für die Änderung der katalytischen Aktivität ist in Abbildung 1 dargestellt. Die katalytische Komponente bzw. der Zugang zur katalytischen Komponente (1) ist für den Umsatz eines Substrates (S) entscheidend. Der Zugang des Substrates zum Katalysator wird durch die Geometrie und Größe des Substrates selbst aber auch durch die Geometrie und Größe der katalytischen Komponente und der Sonde bestimmt. Zudem ist die relative Position der katalytischen Komponente zu bestimmten Bereichen der Sonde (2) entscheidend.

Unter der Annahme der in Abbildung 1 angegebenen relativen Abmessungen sowie Geometrien und unter der Annahme, dass keine Van der Waals und elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten auftreten, können die in Abbildung 2 und 3 dargestellten lokalen Abhängigkeiten der katalytischen Aktivität abgeleitet werden. Sowohl die Sonde als auch der Zugang zur katalytischen Komponente werden hierbei vereinfachend als Kreisflächen mit gleichen Radien definiert. Dem Substrat wird hierbei eine Kugelgeometrie zugeschrieben. Befindet sich die Sonde in  $x^*$  und  $y^*$  Position wird dem Substrat der Zugang zur katalytischen Komponente frühestens bei einem Grenzabstand ( $z_G$ ) möglich, der zumindest dem Durchmesser des kugelförmigen Substrates ( $d_S$ ) entsprechen muss. Da bei kurzen Abständen zwischen Sonde und Zugang zur katalytischen Komponente noch mit einer signifikanten Diffusionslimitierung (Biszwanger 1994) durch die Sonde zu rechnen ist, steigt die katalytische Aktivität erst allmählich an, um sich dann einem Maximum anzunähern (Abb. 2).

Dies gilt natürlich nur, wenn sich die Sonde in  $x^*$  und  $y^*$  Position befindet. Die Abhängigkeit des Systems von den Raumkoordinaten  $x$  oder  $y$  wird deutlich, wenn  $z$

im Grenzfall gleich Null gesetzt wird und die Sonde direkt über dem Zugang deckungsgleich zu liegen kommt. Wird die Sonde bei konstanter  $x^*$  Position in  $y$  Richtung verschoben bzw. vice versa, ergibt sich entsprechend den Gegebenheiten und Annahmen aus Abbildung 2 die Abhängigkeit, die in Abbildung 3 dargestellt ist.

Letzten Endes resultiert die katalytische Aktivität aus der Wahrscheinlichkeit, mit der ein Substrat Zugang zum Katalysator bzw. katalytischen Zentrum hat und damit aus der Überlagerung der Einflüsse aller Raumkoordinaten, der katalytischen Komponenten, der Sonde und des Substrats selbst. Auch wenn elektrostatische und Van der Waalsche Wechselwirkung in dieser Betrachtung vernachlässigt wurden, wirken sich diese dennoch aus. Der Verlauf der Abhängigkeiten sollte hierdurch jedoch nicht wesentlich beeinflusst werden.

Da nun durch die Variation der räumlichen Gegebenheiten in relativ engen Bereichen drastische Aktivitätsunterschiede erzielt werden können, eignet sich der Einsatz des erfindungsgemäßen molekularen Schalters hervorragend, um einen Analyten nachzuweisen. Die Bindung eines Analyten an die Sonde ändert die Position der relevanten Bereiche der Sonde gegenüber der katalytischen Komponente und damit auch die Aktivität des gesamten Systems derart signifikant, dass ein spezifischer und sensitiver Nachweis von Analyten möglich wird.

Bei denen im Folgenden dargestellten Ausführungsbeispielen besteht der molekulare Schalter (3) i.d.R. aus einer Sonde (4), die mit der katalytischen Komponente (5) direkt oder mittels einer Kopplungskomponente (6) konjugiert ist. Der Zugang zum Katalysator (1) wird durch die Struktur bzw. Oberfläche (9) der katalytischen Komponente (5) begrenzt. Bei dieser Struktur kann es sich um einen Träger, eine Membran bzw. um eine Matrix handeln, mit denen der molekulare Schalter verbunden bzw. an die er fixiert sein kann (immobilisierter molekularer Schalter).

Träger können beispielsweise Gläser, Topase, Polymere, Kunststoffe, Keramiken und andere Verbundwerkstoffe sein, die mit Poren versehen sind, welche den Zugang zum eigentlichen Katalysator ermöglichen. Es ist ebenfalls denkbar, dass diese Träger beschichtet sind, beispielsweise mit Membranen oder Matrices, um



entsprechende Porenstrukturen zu erzeugen und/oder um gegebenenfalls die Kopplung einer Sondenkomponente zu ermöglichen. In diesem Zusammenhang sei auf photolithographische Verfahren oder Äzstechniken verwiesen.

Es ist außerdem denkbar, dass statt eines Zuganges zu einem Katalysator, der Katalysator selbst in diese Position gebracht wird. Dies ist zum Beispiel bei der Verwendung von Metallkatalysatoren oder Elektroden als katalytische Komponente denkbar. Hierbei kommen beispielsweise Oberflächen in Frage, bei denen der Träger diskrete metallische Bereiche aufweist.

Die dargestellte Struktur bzw. Oberfläche (9) kann natürlich z.B. auch die Oberfläche eines Enzyms sein, welche den Zugang zum katalytischen Zentrum oder einer Bindungsstelle für einen allosterischen Liganden umgibt. Generell kann diese Struktur (9) jedweder Matrix entsprechen, die den Sondenbereich vom Katalysatorbereich des Schalters trennt bzw. den Zugang zum Katalysator oder dem katalytisch aktiven Zentrum umgibt. In diesem Fall ist der molekulare Schalter in der Regel nicht immobilisiert bzw. befindet sich in der mobilen Phase des Reaktionsgemisches.

Der Analyt befindet sich bevorzugt in der flüssigen bzw. mobilen Phase des Reaktions- oder Testgemisches.

Ausführungsbeispiel für nicht-hybridisierte Einzelstrang-Sonden :

Beim Ausführungsbeispiel mit einer zunächst nicht hybridisierten Einzelstrang-Sonde (Abbildung 4) besteht der molekulare Schalter (3) aus einer Einzelstrang-Sonde (4), die mit der katalytischen Komponente (5) direkt oder gegebenenfalls mittels einer Kopplungskomponente (6) verbunden sein kann. Der Aufbau des molekularen Schalters mit einer Einzelstrang-Sonde ermöglicht unter entsprechenden Hybridisierungsbedingungen die Bindung eines Analyten (A1), beispielsweise einzelsträngige RNA oder DNA, an die Sonden-Komponente (4). Hybridisiert ein Analyt (A1), wird der Zugang zum katalytischen Zentrum (1) eingeschränkt. Damit sinkt die katalytische Aktivität des Systems was zum Nachweis des Analyten verwendet wird. Sollen mit diesem System doppelsträngige Nukleinsäuren wie dop-

pesträngige DNA nachgewiesen werden, muss zunächst deren Denaturierung erfolgen. Anschließend erfolgt die Hybridisierung des homologen Stranges mit der Sonden-Komponente (Nukleinsäure).

Das System mit einer zunächst nicht hybridisierten Einzelstrang-Sonde eignet sich auch für den Nachweis von Punktmutationen („Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNPs)) (Abbildung 5). Unter entsprechenden Hybridisierungsbedingungen kommt es lediglich zur Hybridisierung des homologen Stranges (10T) des Analyten (10AT) mit der entsprechenden homologen Sonde (4) des molekularen Schalters (3). Die Bindung eines Stranges des Analyten (11CG) ist hingegen nicht möglich, so dass der SNP AT/CG in dem aufgeführten Beispiel nachgewiesen werden kann. A, T, C, G sind analog den gängigen Basenbezeichnungen bei Nukleinsäuren gewählt.

Ausführungsbeispiele für Sonden, die zunächst in hybridisierter Form vorliegen.

Zunächst werden Sonden mit intermolekularen Sekundärstrukturen beschrieben:

Bei Systemen mit hybridisierter, doppelsträngiger Sonde (Abbildung 6) besteht der molekulare Schalter (3) aus einer Sonde (4), die mit der katalytischen Komponente (5) direkt oder gegebenenfalls mittels einer Kopplungskomponente (6) verbunden sein kann. Hierbei ist nur eine bestimmte (Teil-) Komponente (7) der Sonde (4) mit der katalytischen Komponente (5) konjugiert. Eine gebundene homologe (Teil-) Komponente (8) der Sonde (4) schränkt den Zugang (1) zum Katalysator ein.

Vorzugsweise ist die Sonde (4) dabei so zu wählen, dass die Bindung der Sondenkomponente (8) mit dem Analyten (A1) stabiler ist, als die Bindung der Sondenkomponenten (7) und (8) untereinander. Dies kann dadurch erzielt werden, dass der Hybrid aus der Sondenkomponente (8) und dem Analyten (A1) mehr homologe Basenpaare umfasst, als der Hybrid der beiden Sondenkomponenten (7) und (8). Damit ist die Stabilität bzw. Schmelztemperatur des Hybrids zwischen der Sondenkomponente (8) und dem Analyten (A1) höher als die der Sonde (4).

Zunächst werden durch eine entsprechend Erhöhung der Temperatur und/oder anderweitige Änderung der Versuchsbedingungen (VB1), beispielsweise der Salzkonzentration, die Sondenkomponenten (7) und (8) voneinander getrennt. Eine weitere Änderung der Versuchsbedingungen (VB2), beispielsweise die Erniedrigung der Temperatur, führt dann zunächst zur Assoziation der Sondenkomponente (8) mit dem Analyten (A1) bevor eine Reassoziations der Sondenkomponenten (7) und (8) erfolgen kann, da die Assoziationsstabilität bzw. die Schmelztemperatur oder Reassoziationsstabilität des Hybrids der Sondenkomponente (8) mit dem Analyten (A1) höher als die der Sonde (4), d.h. der Sondenkomponenten (7) und (8) untereinander ist. Die Spezifität und Sensitivität eines solchen Systems liegt über der eines Systems, bei dem die Schmelztemperaturen vergleichbar sind.

Werden doppelsträngige Nukleinsäuren, wie doppelsträngige DNA, nachgewiesen, ist der Aspekt einer höheren Stabilität des Hybrids der Sondenkomponente (8) mit dem Analyten (A1) gegenüber der Stabilität der Sonde (4) unter Umständen entscheidend.

Hierdurch wird die Assoziation des dem Analyten homologen Stranges mit der Sondenkomponente (7) reduziert oder verhindert. Eine derartige Assoziation würde überwiegend in einem Austausch der Hybridisierungspartner münden, und damit keinen effektiven Nachweis des Analyten ermöglichen, da so keine Konformationsänderung der Sonde und damit keine Änderung der katalytischen Aktivität der katalytischen Komponente stattfinden würde.

Statt unterschiedlich langer Sondenkomponenten (7) und (8) ist es ebenfalls denkbar, gleich lange zu verwenden, die jedoch mindestens einen „Mismatch“ aufweisen (Abbildung 7). Das heißt, dass innerhalb der homologen Bereiche an mindestens einer Stelle keine Basenpaarung stattfindet. Dieser „Mismatch“ sollte vorzugsweise im mittleren Bereich der Sonde (4) liegen. Dieser „Mismatch“ destabilisiert somit die Sonde (4) gegenüber dem entsprechenden Bereich der Analyten (12). Der „Mismatch“ der Sonden ist hierbei so zu wählen, dass bei entsprechenden Versuchsbedingungen, die Sondenkomponente (8) mit den nachzuweisenden, homologen Strängen 12<sub>c</sub> hybridisiert, der Strang 12<sub>c</sub> aber nicht mit der Sondenkomponente (7) hybridisiert. Dies kann beispielsweise durch die Wahl geeig-

neter Rehybridisierungstemperaturen erfolgen. Zwar werden beim Rehybridisierungsprozess die Sondenkomponente (8) und der Strang 12<sub>G</sub> um eine Bindung an den Analytensträngen 12<sub>C</sub> konkurrieren, aber dieser Kompetitionsprozess liefert entsprechende Verhältnisse von molekularen Schaltern unterschiedlicher Aktivität, was dann bestimmt werden kann. Zudem ist die Reassoziationsgeschwindigkeit kurzer Sondenkomponenten 8 an die Analytenstränge 12<sub>C</sub> höher als die Reassoziationsgeschwindigkeit der Analytenstränge 12<sub>G</sub> mit den Analytensträngen 12<sub>C</sub>. Damit werden sich überwiegend Hybride aus Sondenkomponente (8) und Strang 12<sub>C</sub> bilden.

#### Sonden mit intramolekularer Sekundärstruktur:

Des Weiteren kann der Einsatz der in Abbildung 8 dargestellten Sondenstruktur hilfreich sein, störende Hybridisierungsvorgänge zu vermeiden. Hierbei besteht die Sonde (4) lediglich aus einer an der katalytischen Komponente (5) gebundenen Sondenkomponente, die über einen intramolekular hybridisierten Bereich verfügt. In Gegenwart eines Analyten (13) wird die entsprechende homologe Struktur (14) mit der Sonde hybridisieren und hierbei die intramolekulare Hybridisierung der Sonde aufgelöst. Eine störende Hybridisierung durch den Strang (15) des Analyten mit der Sonde (4) kann somit ausgeschlossen werden.

In einer besonderen Ausführungsform (Abbildung 9) wird die Sonde (4) mit intramolekularer Sekundärstruktur (z.B. eine Nukleinsäure) sowohl am 5' als auch am 3' Ende mit der katalytischen Komponente (5) direkt oder gegebenenfalls über Kopplungskomponenten (6) konjugiert. Im intramolekular hybridisierten, geschlossenen Zustand ist der Zugang zum Katalysator (1) durch die Sonde eingeschränkt. Der mit dem Analyten intermolekular hybridisierte, offene Zustand der Sonde hingegen bietet einem Substrat einen besseren Zugang (1) zum Katalysator (5).

Handelt es sich bei den katalytischen Komponenten (5) um Enzyme (E) (Abbildung 10 und 11) können neben dem Einfluss auf den Zugang zum katalytischen Zentrum (1) weitere Effekte wie Konformationsänderungen (KÄ) an der katalytischen Komponente selbst auftreten, die dann wiederum zu einer Änderung der



katalytischen Aktivität führen. Das Enzym (5) liegt somit in mindestens zwei unterschiedlich katalytisch aktiven Formen, E1 und E2, vor. Die in den Abbildungen 10 und 11 gewählten Ausführungsformen der Sonden können natürlich auch durch andere erfindungsgemäße Ausführungsformen ersetzt werden.

Diese Konformationsänderungen (KÄ) an der katalytischen Komponente des molekularen Schalters können insbesondere bei Enzymkomplexen auftreten, die aus mehreren Untereinheiten aufgebaut sind. In Abbildung 11 ist beispielhaft der Einfluss auf ein Homodimer einer Diaphorase dargestellt, dessen katalytische Aktivität von der Interaktion der Untereinheiten (U1 und U2) bestimmt wird, so dass hier ebenfalls mindestens zwei katalytisch unterschiedlich aktive Formen, E1 und E2, vorliegen können.

In einer besonderen Ausführungsform (Abbildung 11 B) kommt es hierbei zur vollständigen Trennung der Untereinheiten (U1 und U2) des Enzyms, was sich naturgemäß besonders dramatisch auf die enzymatische Aktivität auswirkt und somit für den Nachweis eines Analyten von besonderem Interesse sein kann. Auch in diesem Fall kann die dargestellte Ausführungsform der Sonde durch andere erfindungsgemäße Ausführungsformen ersetzt werden.

Im Folgenden werden beispielhaft mögliche zusätzliche Bestandteile der Sonden-Komponente beschrieben:

a) Affine Strukturelemente (vgl. Abbildung 12):

Werden affine Strukturelemente 16 wie Antikörper, Affibodies®, Aptamere, etc. in der Sonden-Komponente (4) (z.B. einer Nukleinsäure) bzw. in mindestens einem Sondenstrang (7 und/oder 8) oder einem Bereich einer Sonde mit intramolekularer Sekundärstruktur integriert, ist es möglich, neben Nukleinsäuren auch andere Analyten (17) nachzuweisen (Abbildung 12). Die Bindung eines Analyten an das affine Strukturelement verhindert die (Re)assoziation der Sonden-Komponente 4 teilweise oder vollständig, so dass der Zugang zum Katalysator frei ist.

Werden nicht hybridisierte Einzelstrangsonden verwendet, müssen homologe Stränge dem Reaktionsansatz zugesetzt werden. Diese homologen Stränge konkurrieren dann mit den Analyten um die Bindung an die Einzelstrangsonden. Bindet der Analyt, ist der molekulare Schalter katalytisch aktiv. Bindet bzw. hybridisiert der homologe Strang, wird der Zugang zum katalytischen Zentrum (1) blockiert, so dass der molekulare Schalter nicht oder zumindest weniger katalytisch aktiv sein wird. In Abhängigkeit der Konzentration der molekularen Schalter, der homologen Stränge und insbesondere des Analyten ergibt sich so eine Gesamtaktivität des Systems, die von der Analytenkonzentration abhängt.

b) Strukturelemente mit Einfluss auf den Zugang zur katalytischen Komponente (vgl. Abbildung 13):

Um den Einfluss auf den Zugang eines Substrates zur katalytischen Komponente zu erhöhen, können Sonden-Komponenten in entsprechenden Bereichen mit weiteren Komponenten, Blockierungskomponenten, (18) konjugiert werden (Abbildung 13 A). Hierzu können beispielsweise Makromoleküle wie Proteine (Albumin, Streptavidin, etc. ) an den entsprechenden Stellen mit der Sonde gekoppelt werden. Es ist natürlich auch denkbar hierfür niedermolekulare Substanzen einzusetzen.

Insbesondere kann es sich bei der Komponente (18) wiederum um einen Bindungspartner eines anderen Moleküls (19) handeln (Abbildung 13-B, C). Beispielsweise kann es sich hier um Bindungspartner bzw. Komplexe bestehend aus Ligand/Rezeptor, Antigen/Antikörper, Affibody®, Aptamer oder um Substrat, Inhibitor/Enzym handeln. Wird nun einer der affinen Bindungspartner (19) mit der katalytischen Komponente (5) verknüpft, kann dies die Effizienz des molekularen Schalters verbessern, da der Zugang zum katalytischen Zentrum hierdurch besser blockiert wird. Bei der Bindung eines Analyten an die Sonde wird die Bindung zwischen den Bindungspartnern (18) und (19) gelöst, so dass der Zugang zum Katalysator wieder frei ist. In den unter b) genannten Fällen ist die Sonde (4) neben z.B. einer Kopplung über eine Kopplungskomponente (6) bevorzugt auch über die Komponenten (18) oder (18) und (19) mit der katalytischen Komponente (5) verbunden.

Aufgrund der Eigenschaft der Dissoziation der Bindungspartner (18) und (19) bei der Bindung eines Analyten an die Sonde unter den entsprechenden Versuchsbedingungen unterscheiden sich diese nicht-kovalenten Bindungskomplexe von den Konjugations- bzw. Kopplungskomponenten (6), die eine permanente Bindung der Sonden-Komponente (4) mit der katalytischen Komponente (5) unter Standardbedingungen bewirken.

Bei der in Abbildung 13 C beispielhaft dargestellten Ausführungsform zeigt sich, dass eine intramolekulare Hybridisierung der Sonde nicht zwingend erforderlich ist. Es kann demnach auch eine nicht-hybridisierte, einzelsträngige Sonde eingesetzt werden, die neben der direkten Kopplung oder indirekten Kopplung durch eine Kopplungskomponente (6) zudem über die Bindung der Bindungspartner (18) und (19) mit der katalytischen Komponente verknüpft ist.

Der Einsatz derartiger Systeme würde zudem den Aufbau von Competitionstests ermöglichen. Hierbei ist der nachzuweisende Analyt gleichzeitig einer der Bindungspartner (18) oder (19). In Gegenwart des Analyten wird somit ein gewisser Anteil an Bindungen zwischen den Sonden-Komponenten und den katalytischen Komponenten verhindert, was sich auf die katalytische Aktivität des Systems auswirkt, so dass der Analyt quantifiziert werden kann.

Prinzipiell ist es außerdem denkbar, auch die Kopplungskomponente (6) durch eine Bindung des Bindungspaares (18) und (19) mit höherer Bindungsreversibilität zu ersetzen. In diesem Fall würde bei vollständiger Bindung durch Analyten an die Sonde die Sonde letzten Endes von der katalytischen Komponente vollständig getrennt werden.

Beim Einsatz von Enzymen (E) ergeben sich weitere Möglichkeiten von denen einige in Abbildung 13 D-H dargestellt sind. Als Bindungspartner kommen hier aktive oder allosterische Zentren der Enzyme und die entsprechenden Liganden (18) wie Substrate, Cosubstrate, prosthetische Gruppen, Inhibitoren, etc. in Frage. Die Sonde ist hierbei über mindestens einen Liganden (18<sub>1</sub>) mit dem Enzym verbunden (Abb. 13 D-H): Hierbei kann prinzipiell jedwede erfindungsgemäße Son-

denstruktur verwendet werden, d.h. sowohl intermolekular hybridisierte (Abb. 13 D, E, G), intramolekular hybridisierte sowie nicht hybridisierte (Abb. 13 F, H). Die Sonde kann über weitere Kopplungskomponenten (6) (Abb. 13 D) oder weitere Liganden (18<sub>2</sub>) mit dem Enzym als katalytischer Komponente verbunden sein. Die Gegenwart eines Analyten führt dann, unter den entsprechenden Versuchsbedingungen, aufgrund von Konformationsänderungen und/oder der Änderung der Zugänglichkeit zum aktiven Zentrum, zur Änderung der katalytischen Aktivität des Enzyms.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform werden Sonden-Komponenten, die nicht kovalent an die katalytische-Komponente konjugiert sind, in folgender Art und Weise eingesetzt. Statt die katalytische Komponente, insbesondere ein Enzym, von Anfang an im Ansatz zu haben, wird das Enzym erst nach der Hybridisierungsreaktion, bei welcher der Analyt an die Sonde gebunden wird, zugegeben. In Abhängigkeit von der Hybridisierung der Sonden-Komponente mit dem Analyten wird die Bindung an die katalytische Komponente beeinflusst und damit auch die Aktivität der katalytischen Komponente, die über entsprechende Reaktionen bestimmt werden kann, um den Analyten qualitativ oder quantitativ nachzuweisen.

Vorzugsweise werden hierbei Sonden-Komponenten eingesetzt, die über mindestens einen Liganden, wie ein Substrat, ein Cosubstrat, eine prosthetische Gruppe, einen allosterischen Aktivator bzw. Inhibitor und/oder einen generellen Inhibitor, sowohl reversible als auch irreversible, verfügen (siehe Abb. 13 E-H) eingesetzt.

Beispielsweise ist ein Aktivator, der an eine Sonden-Komponente gekoppelt ist und mit einem Analyt hybridisiert ist, nicht mehr in der Lage, eine katalytische Komponente, insbesondere ein Enzym, so zu aktivieren, wie eine freie Aktivator-Sonden-Komponente. Die über mindestens eine entsprechende Reaktion gemessene Aktivität der katalytischen Komponente dient dann zum Nachweis des Analyten. Entsprechendes gilt für Inhibitoren. Werden Substrate, Cosubstrate und/oder prosthetische Gruppen verwendet, die an eine Sonden-Komponente gekoppelt sind, wirken sich die jeweiligen freien und die Analyt-gebundenen Konju-



gate ebenfalls unterschiedlich auf die katalytische Aktivität der katalytischen Komponente aus und können so zum Nachweis des Analyten eingesetzt werden.

Im Folgenden werden beispielhaft Membran- und Matrixsysteme beschrieben, die als erfindungsgemäße Testsysteme dienen können:

#### Abbildung 14:

Bei diesen Systemen trennen Membranen oder Matrices (20), die über entsprechende Porenstrukturen und Permeabilitätseigenschaften (21) verfügen, den Probenraum (22) vom Katalysatorraum (23), in dem sich der Katalysator (24) befindet; ab. Sondenkomponenten (25/Pfeile) im Probenraum (22) und/oder im Katalysatorraum (23) beeinflussen in Abhängigkeit von der Analytenkonzentration den Transfer von Substraten und/oder Produkten über die Membran bzw. Matrix (20). Der somit von der Analytenkonzentration abhängige Transfer von Substrat aus dem Probenraum in den Katalysatorraum bestimmt damit den Umsatz von Substrat im Katalysatorraum. Es ist natürlich auch denkbar, dass der Transfer von Produkt (umgesetztem Substrat) vom Katalysatorraum in den Probenraum in Abhängigkeit von der Analytenkonzentration beeinflusst wird. Die jeweiligen Transferaten von Substrat und Produkt hängen von deren Eigenschaften, insbesondere der Molekülgröße und der Ladungseigenschaften sowie Hydrophobizität, ab.

#### Abbildung 14 A:

Beispielsweise kann ein derartiges System aus Katalysatoren, bevorzugt in Form von Enzymen (24), bestehen, die in einer partikulären Matrix, beispielsweise Acrylamid oder Agarose, immobilisiert bzw. eingebettet sind. In diesem Fall entspricht der Innenraum der Matrix dem Katalysatorraum (23) und die Oberfläche dieser Matrix einer Membran (20), die eine poröse Struktur aufweist (21). Es ist ebenfalls denkbar Katalysatoren bzw. Enzyme in Partikel einzuschließen, ohne dass diese hierbei notwendigerweise im Partikelinnenraum in einer Matrix eingebettet sein müssen. Die Oberfläche der Partikel ist mit Sondenkomponenten konjugiert (25), die in Abhängigkeit der Analytenkonzentration den Transfer von Substrat und/oder Produkt zwischen dem intrapartikulären Katalysatorraum (23) und dem extrapartikulären Probenraum (22) steuern. Suspensionen derartiger Partikel können in

entsprechenden Reaktionsgefäßen zum Nachweis von Analyten (in der flüssigen Phase der Suspension) eingesetzt werden.

#### Abbildung 14 B:

Im Gegensatz zu einer mikroskopischen Trennung von Proben- und Katalysatorraum kann auch eine makroskopische Trennung dieser Kompartimente unter Verwendung entsprechender Reaktionsgefäße erfolgen. Die Trennung von Probenraum (22) und Katalysatorraum (23) erfolgt hierbei durch eine poröse Membran bzw. Matrix (20) die mit Sondenkomponenten (25/Pfeil) versehen ist. Im dargestellten Beispiel steuern die Sondenkomponenten (25) in Abhängigkeit der Konzentration eines Analyten den Durchtritt von Substrat (S) vom Probenraum (22) in den Katalysatorraum (23). In Abhängigkeit der Eigenschaften von Substrat (S) und Produkt (P) (umgesetztes Substrat), ist es natürlich ebenfalls denkbar, dass der Transfer von Produkt über die Membran kontrolliert wird. Die Einflussnahme auf den Transfer beider Substanzen, Substrat und Produkt, ist ebenfalls denkbar.

Im Katalysatorraum (23) wird das Substrat umgesetzt. Im angegebenen Beispiel ist der Katalysator im Reaktionsgefäß integriert bzw. immobilisiert. Solange der Katalysator, insbesondere ein Enzym nicht vom Katalysatorraum (23) in den Probenraum (22) gelangen kann, ist es denkbar gelöste bzw. suspendierte Katalysatoren zu verwenden. Hierbei kann es sich auch um gelöste bzw. suspendierte Katalysatoren bzw. Enzyme, etc. handeln, die in immobilisierter Form vorliegen.

In Abhängigkeit seiner Eigenschaften, der Membran und der Sonde konzentriert sich das generierte Produkt (P) im Katalysatorraum (23) (Abb. 14 B) oder diffundiert ebenfalls in den Probenraum (22). In Abhängigkeit des verwendeten Systems kann es hier nun von Vorteil sein, eine optische Detektion beispielsweise nur im Katalysatorraum (23) durchzuführen. Die Membran (20) kann den Transfer von Substanzen der Probe in den Katalysatorraum (23) unterbinden, so dass störende „Matrixeffekte“ (Zipper, Buta et al. 2003) reduziert werden. Neben der optischen Detektion durch Absorptions- oder Lumineszenzmessungen, bietet der beschriebene Aufbau natürlich auch die Möglichkeit osmotischer Vergleichsmessungen zwischen dem Probenraum (22) und dem Katalysatorraum (23), wie auch die ent-

sprechende Verwendung elektrischer Parameter wie Strom, Spannung, Widerstand und Impedanz.

Generell kann bei diesem Ausführungsbeispiel das Anlegen einer Potentialdifferenz zwischen dem Probenraum (22) und dem Katalysatorraum (23) vorteilhaft sein, da so elektrophoretische Aspekte ausgenutzt werden können. Beispielsweise kann der elektrophoretisch beschleunigte Transfer von Substrat oder Produkt über die Membran die Detektion positiv beeinflussen.

In den Abbildungen 15 und 16 wird eine besondere Ausführungsform des erfindungsgemäßen analytischen Testsystems dargestellt. In dieses Testsystem, umfassend einen molekularen Schalter, der eine Sonde und eine katalytische Komponente aufweist, wird zusätzlich mindestens eine Komponente eingebunden, die eine unterschiedliche Affinität zur hybridisierten und nicht-hybridisierten Form der Sonde aufweist. Diese sogenannte Selektivkomponente (26) kann Teil der Kopplungskomponente (6) sein (Abb. 15 A, C und Abb. 16), welche die Sonde mit der katalytischen Komponente (5) verbindet oder mit der Kopplungskomponente (6), der Sonde (3) und/oder der katalytischen Komponente (5) (Abb. 15 C).

Bei den Selektivkomponenten kann es sich um jedwede chemische Verbindung handeln, die selektiv an hybridisierte oder nicht-hybridisierte Sonden binden kann, d.h. unterschiedliche Bindungskonstanten bzw. Affinitäten aufzeigt.

Beispielsweise kann es sich hierbei um Nukleinsäure-bindende Proteine oder Peptide handeln, die vorzugsweise an einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäuren binden oder an Nukleinsäuren, die in triplexen, quadruplexen oder sonstigen Hybridisierungszuständen vorliegen. Proteine, die vorzugsweise an doppelsträngige Nukleinsäuren binden, sind beispielsweise DNA-bindende Proteine wie Transkriptionsfaktoren insbesondere Transkriptionsaktivatoren, beispielsweise „Zinkfingerproteine“ wie Zif 268, Proteine mit einem Helix-Turn-Helix-Motiv wie der Lac-Repressor oder Proteine mit einem Helix-Turn-Helix-ähnlichen Motiv wie die Homöodomäne, etc. (Nelson and Cox 2001).

Proteine, die vorzugsweise an einzelsträngige Nukleinsäuren binden, sind beispielsweise „single-stranded binding proteins“ (SSBs). Peptide, die vorzugsweise an doppelsträngige Nukleinsäuren binden sind ebenfalls einzusetzen wie beispielsweise Ni(II)D/L-Arg-Gly-His, 1,2-Dihydro-(3 H)-Pyrrolo[3,2- e]Indol-7-Carboxylat (Fang et al. 2004).

Neben Proteinen und Peptiden sind auch andere, niedermolekulare Substanzen einsetzbar. Beispielsweise interagieren Interkalatoren, Semi-Interkalatoren und an der Nukleinsäuroberfläche bindende Substanzen selektiv mit hybridisierten bzw. nicht-hybridisierten Nukleinsäuren, beispielsweise mit doppelsträngigen oder einzelsträngigen Nukleinsäuren. Hierbei kann es sich beispielsweise um bestimmte Antibiotika, Cytostatika oder Chemotherapeutika wie Netropsin, Antitumorantibiotikum (+)-CC-1065, Chromomycine (Chromomycin A3), Actinomycine, Anthracycline, beispielsweise Adriamycin, Mithramycin, Distamycin A, Brostallicin (PNU-166196), handeln. Es ist ebenfalls denkbar, Hybridmoleküle einzusetzen, die aus verschiedenen Komponenten aufgebaut sind wie S-3-nitro-2-pyridinesulfenylcysteine (Baraldi et al. 2001; Shim et al. 2004).

Außerdem kommen Phenanthridine wie Ethidiumbromid, Ethidiumhomodimer-1, Ethidiumhomodimer-2, Hexidiumiodid, Propidiumiodid und Dihydroethidium, Indole und Imidazole wie DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) und DAPI (4',6-(diimidazolin-2yl)-2-phenylindole dihydrochloride), Bisbenzimidfarbstoffe wie Hoechst 33258 und 33342, Acridine wie Acridin-Orange, Acridinhomodimer, ACMA (9-Amino-6-Chloro-2-Methoxyacridine) und Cyaninfarbstoffe wie SYBR Farbstoffe, z.B. SYBR Green I und SYBR Green II, SYBR Gold, SYBR Safe, PicoGreen, OliGreen, RiboGreen, TO-PRO (1, 3, 5, etc.), PO-PRO (1, 3, 5, etc.), BO-PRO (1, 3, 5, etc.), YO-PRO (1, 3, 5, etc.), Cyanindimere, wie POPO (1, 3, 5, etc.), BOBO (1, 3, 5, etc.), YOYO (1, 3, 5, etc.), TOTO (1, 3, 5, etc.), JOJO (1, 3, 5, etc.), LOLO (1, 3, 5, etc.), SYTOX- und SYTO-Farbstoffe, (7-Amino-)Actinomycin D, Hydroxystilbamidine, LDS 751, etc. (Haugland 2002; Vitzthum and Bernhagen 2002) aber auch polykationische Verbindungen wie Ornithine und Spermidine sowie die Derivate, Dimere und Polymere der oben genannten Verbindungen in Frage.



Im Folgenden werden Modulationen im Testsystem beschrieben, die auf der Art der verwendeten Reaktanten bzw. deren Wechselwirkung beruhen:

Anhand der beschriebenen Grundlagen für die Aktivitätsänderung des molekularen Schalters in Gegenwart eines Analyten wird deutlich, dass bei der Verwendung von Substraten unterschiedlicher Größe, die beschriebenen sterischen Gegebenheiten dazu verwendet werden, unterschiedliche Substratspezifitäten zum Nachweis des Analyten einzusetzen. Kleinere Substrate besitzen einen besseren Zugang zum Katalysator als große Substrate und werden daher mit höherer Wahrscheinlichkeit umgesetzt. Erst wenn durch die analyten-spezifische Konformationsänderung auch großen Substraten ausreichender Zugang zum Katalysator verschafft wird, werden diese signifikant umgesetzt.

Allgemein gilt, dass der Analyt Bestandteil des Substrats sein kann, bevorzugt aber nicht ist. Das Vorhandensein eines Analyten in einer Probe wird dadurch bestimmt, dass ein für den Analyt spezifischer molekularer Schalter und ein auf das Anzeigesystem abgestimmtes Substrat zugesetzt wird. Der Umsatz des Substrats an der katalytischen Komponente (bevorzugt ein Enzym oder eine katalytisch wirksame Nukleinsäure) ist dann der quantitative Indikator für das Vorhandensein eines Analyten. Der Substratumsatz ist somit in der Regel die gemessene Hilfs- oder Sekundärreaktion.

Die jeweiligen Reaktionen von kleinen und großen Substraten können hierbei prinzipiell parallel oder getrennt voneinander durchgeführt werden. Der parallele Umsatz zweier oder mehrerer Substrate ist dann sinnvoll, wenn die Substrate unabhängig voneinander defektiert werden können oder, im Sinne einer Competition bzw. Inhibition, der Umsatz einer der Substanzen so verändert wird, dass dieser Vorgang detektiert werden kann. Dies hat den Vorteil, dass sowohl der ursprüngliche als auch der analyteninduzierte Konformationszustand des molekularen Schalters nachgewiesen werden kann.

Bei der Quantifizierung von Analyten ist dies von Bedeutung, da hier in der Regel nicht nur ein molekularer Schalter, sondern mehrere molekulare Schalter gleichzeitig im System eingesetzt werden. Im Idealfall sollte die Summe der jeweiligen

relativen Aktivitäten im System konstant bleiben. Ist dies nicht der Fall, deutet dies auf unerwünschte Nebeneffekte hin. Dies können unspezifische Konformationszustände wie die Zerstörung bzw. Denaturierung des Katalysators sein oder die Gegenwart unbekannter Störstoffe bzw. Inhibitoren in der Probe (Matrixeffekte). Somit kann durch diese interne Kontrolle die Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit des Systems verbessert werden.

Es ist beispielsweise denkbar, dass vergleichbare Konzentrationen eines kleinen und eines großen Substrates eingesetzt werden, wobei die Affinität des großen Substrates über der des kleinen liegt. Vorzugsweise sind die Konzentrationen in einem Bereich zu wählen, der jeweils zu einer Reaktion 1. Ordnung führt. Verfügt nun das große Substrat über eine höhere Affinität im Vergleich zum kleineren, verschiebt sich bei einer analyteninduzierten Konformationsänderung, die den Zugang zum Katalysator verbessert, der Umsatz um so deutlicher in Richtung des großen Substrates je größer der Affinitäts- und Größenunterschied zwischen den Substraten ist. Führt die analyteninduzierte Konformationsänderung zu einem schlechteren Zugang zum Katalysator, reagiert das System in umgekehrter Weise.

Ebenso ist es denkbar, dass unterschiedlich große Substrate vergleichbarer Affinitäten eingesetzt werden. Das kleinere Substrat wird hier vorzugsweise in einem Konzentrationsbereich eingesetzt der zu einer Reaktion 1. Ordnung führt. Das größere Substrat wird hingegen im Überschuss zugesetzt, so dass vorzugsweise nach einer Reaktion 0. Ordnung umgesetzt wird. Unter diesen Bedingungen verschiebt sich bei einer analyteninduzierten Konformationsänderung, die den Zugang zum Katalysator verbessert, der Umsatz um so deutlicher in die Richtung des großen Substrates je größer der Konzentrationsunterschied zwischen den Substraten ist bzw. um so niedriger die Konzentration des kleinen Substrates ist. Führt die analyteninduzierte Konformationsänderung zu einem schlechteren Zugang zum Katalysator, reagiert das System in umgekehrter Weise. Da bei der Detektion zur Empfindlichkeitssteigerung bzw. zur internen Kontrolle, d.h. Negativ- versus Positivkontrolle, beide Substrate bestimmt werden, sollte die Konzentration des kleinen Substrates nicht zu niedrig werden. In diesem Falle sind unter Kombination des Aspektes der Detektion sowie der Substratkompetition jeweils optimal angepasste Substratkonzentrationen einzusetzen.

Es ist natürlich auch denkbar entsprechend der obigen Beschreibung kleine Substrate mit niedrigen Affinitäten in einem Konzentrationsbereich einzusetzen, der zu einer Reaktion 1. Ordnung führt und große Substrate mit hohen Affinitäten zu verwenden, die im Substratsättigungsbereich, d.h. Reaktion 0. Ordnung, eingesetzt werden.

Statt einer Substratkompetition, ist es ebenfalls denkbar Inhibitionsbedingungen zu schaffen, indem nicht Substratkombinationen sondern Substrat-Inhibitor kombinationen in den oben beschriebenen Verfahren eingesetzt werden.

Sind keine großen Substrate vorhanden, können erfindungsgemäß aus kleinen Substraten durch Konjugation mit Substanzen große Substrate hergestellt werden. In Abhängigkeit von der Größe der verwendeten Substanz können unterschiedlich große Substrate erzeugt werden. Damit ergibt sich die Möglichkeit, die katalytische Aktivität des Systems in gewissen Grenzen zu modulieren. Dies ist zumindest solange möglich, wie das Konjugat aus Substrat und Substanz noch vom Katalysator umgesetzt werden kann.

Als große Substrate können natürlich auch Substratkonjugate bzw. prosthetische Gruppen wie Liponsäure-Lysylreste von Enzymen aus Multienzymkomplexsystemen ausgenutzt werden. Beispielsweise können bei der Verwendung von Dihydroliponamid-Dehydrogenase als katalytischer Komponente des molekularen Schalters, neben freier Liponsäure und deren Derivaten sowie Formazanfarbstoffen, auch die E-2 Komponenten von 2-Oxosäuredehydrogenase-multienzymkomplexen gegebenenfalls in Kombination mit deren E-1 Komponenten und entsprechender Substrate eingesetzt werden.

Werden als katalytische Komponenten Enzyme, katalytisch aktive Antikörper und Nukleinsäuren eingesetzt, kann natürlich auch der Einsatz unterschiedlicher aber annähernd gleich großer Substrate, Cosubstrate bzw. Inhibitoren sinnvoll sein. Hier kann bei einer Konformationsänderung der Sonde auch eine Konformationsänderung der katalytischen Komponente auftreten. In Folge dieser Konformationsänderungen kann sich die Substratspezifität dieser katalytischen Komponenten

ändern, ohne dass hierbei die Abmessungen des Zugangs zur katalytischen Komponente eine signifikante Rolle spielen. Es ist natürlich ebenfalls denkbar, dass sich Konformationsänderungen, die sich auf die Substratspezifität im eigentlichen aktiven Zentrum auswirken und die die Abmessung des Zuganges zur katalytischen Komponente verändern, ergänzen.

Nachfolgend werden beispielhaft in dem erfindungsgemäßen Testsystem breit einsetzbare Maßnahmen beschrieben, die insbesondere dazu dienen, die Spezifität als auch die Sensitivität des Testsystems gegenüber einem gegebenen Analyten zu erhöhen. Dies hat insbesondere auch bei der quantitativen Analytenbestimmung Bedeutung.

Um die Spezifität und Sensitivität des Nachweises eines Analyten noch zu erhöhen, ist es möglich mehr als nur eine Art von molekularem Schalter an einer Sorte von Analyten zu binden. Es ist z.B. denkbar mindestens zwei verschiedene Arten von molekularen Schaltern mit unterschiedlicher enzymatischer Aktivität einzusetzen, die jeweils an unterschiedlichen Bindungsstellen der identischen Analyten binden. Der Nachweis dieser Analyten erfolgt somit nur dann, wenn sich die enzymatische Aktivität aller an dieser Analytensorte gebunden molekularen Schalter verändert. Die Änderung der enzymatischen Aktivität nur eines molekularen Schalters wäre nicht ausreichend. Damit kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der Spezifität was sich auch positiv auf das Signal-Rauschverhältnis auswirkt und somit die Sensitivität erhöhen kann.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die enzymatischen Aktivitäten der unterschiedlichen molekularen Schalter, die an einer Sorte von Analyten binden, aufeinander abzustimmen. Insbesondere enzymatische Aktivitäten die gekoppelte Reaktionen erlauben sind hierbei zu berücksichtigen. Das heißt, dass das Produkt eines molekularen Schalters das Substrat für einen weiteren molekularen Schalter darstellt, der dieses dann weiter umsetzt. Da nur die Endprodukte der Reaktionen bestimmt werden, beinhaltet diese Bestimmung die Kombination beider Bindungsvorgänge und erlaubt somit einen spezifischen und sensitiven Nachweis des Analyten. Vorzugsweise kann innerhalb der gekoppelten Reaktionen ein Produkt-



Substrat-Zyklus, wie zum Beispiel beim Redox-Cycling, stattfinden. Dies führt zu einer weiteren Erhöhung der Sensitivität.

Beispielsweise können zum Nachweis einer bestimmten Nukleinsäuresequenz zwei molekulare Schalter, einer mit Lactat-Dehydrogenase-Aktivität und einer mit Diaphorase-Aktivität, eingesetzt werden. Diese molekularen Schalter sind so konzipiert, dass ihre Sonden unterschiedliche Bereiche der zu bestimmenden Nukleinsäuresequenz erkennen. Bei der Bindung an die homologen Bereiche werden die jeweiligen Enzymaktivitäten aktiviert. Sind im Reaktionsansatz Lactat, NAD und eine Tetrazoliumverbindung vorhanden, wird es erst dann zu einer Reduktion der Tetrazoliumverbindung zu einem Formazanfarbstoff kommen, wenn beide molekularen Schalter aufgrund der Bindung an den Analyten, die Nukleinsäuresequenz, enzymatisch aktiv geworden sind. Lactat wird zu Pyruvat unter Reduktion des NAD zu NADH durch die Lactat-Dehydrogenase-Aktivität umgewandelt. Das NADH wird dann in der Diaphorase-katalysierten Reaktion bei der Reduktion des Tetrazoliumsalzes zum Formazanfarbstoff zu NAD regeneriert. Letzteres wird im Sinne eines "Redox-Cycling" dann wieder in NADH umgewandelt usw. Die Bestimmung des Formazanfarbstoffes bietet somit die Möglichkeit der spezifischen und sensitiven Bestimmung des Analyten.

Vorzugsweise sind die unterschiedlichen Bindungsstellen der molekularen Schalter möglichst nahe beieinander. Dies ermöglicht einen effizienten Produkt- bzw. Substrat-Transfer zwischen den Enzymen. Bei der Berücksichtigung solcher räumlicher Faktoren ist es denkbar, dass neben molekularen Schaltern auch Enzyme eingesetzt werden können, die mit einer affinen Komponente ausgestattet sind, aber ihre enzymatische Aktivität bei einem Bindungsvorgang nicht ändern. Allein die Tatsache der räumlichen Nähe eines solchen Enzyms würde die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion beeinflussen und sich entsprechend auf die Bestimmung auswirken.

Somit sind die bevorzugten Sonden der erfindungsgemäßen molekularen Schalter Nukleinsäuren oder Nukleinsäurederivate, die durch den Kontakt mit oder durch die Bindung eines Analyten eine Konformationsänderung erfahren, wodurch der Zugang eines Substrates an die katalytische Komponente des molekularen Schal-

ters erleichtert oder erschwert wird. Diese Änderung der katalytischen Aktivität des Schalters bzw. die Änderung des Substratumsatzes ist in der Regel der für die qualitative als auch quantitative Bestimmung eines Analyten zu messende Parameter.

Im Folgenden werden wichtige Aspekte und Elemente der vorliegenden Erfindung zusammengefasst ohne die Erfindung hierauf zu beschränken:

a) Beschreibung der bevorzugten Sonden nach Oberbegriffen / Substanzklassen

Klassifizierung nach dem Hybridisierungszustand:

- Hybridisierte Sonden
  - Intermolekular hybridisierte Sonden
  - Intramolekular hybridisierte Sonden
- Nicht-hybridisierte Sonden

Klassifizierung der Sonden nach ihrem Aufbau bestehend aus

- Nukleinsäure bzw. Nukleinsäurederivat (Rückgrat, Basen), die ggf. mindestens eine Kopplungskomponente und Blockierungskomponente beinhalten aber keine Bindungskomponente. Diese Sonden eignen sich insbesondere für den Nachweis von Nukleinsäuren bzw. Nukleinsäurederivaten.
- Nukleinsäure bzw. Nukleinsäurederivate in Kombination mit mindestens einer weiteren Bindungskomponente (Rezeptoren, Enzyme, Antikörper oder deren Bindungsdomänen sowie Affibodies, Designed Repeat Proteins, Protein Scaffolds, Aptamere, etc.). Ggf. kann auch mindestens eine Kopplungskomponente und/oder Blockierungskomponente zugegen sein. Diese Sonden eignen sich insbesondere für den Nachweis von Analyten, die keine Nukleinsäuren oder Nukleinsäurederivate sind.

b) Beschreibung der bevorzugten katalytischen Komponenten nach Oberbegriffen / Substanzklassen

- anorganische Verbindungen:
  - anorganische Säuren und Basen, Metalle, Legierungen, Metalloxide, Komplexe, Übergangsmetallkomplexe
  - Beispiel: Kaliumhexacyanoferrat (Übergangsmetallkomplex)
- organische Verbindungen:
  - organische Säuren und Basen, Proteine (Enzyme, d.h. klassische Enzyme aber auch Antikörper), Nukleinsäuren mit enzymatischer Aktivität, redoxaktive Aromaten und Heteroaromaten
  - Beispiele: Diaphorase, Hexokinase, Galactose-Oxidase, etc.
- Elektrodensysteme:
  - anorganische Elektrodensysteme (Metalle, Keramiken)
  - organische Elektrodensysteme (leitfähige Kunststoffe, Verbundwerkstoffe/Komposite)
  - Beispiel: Goldelektrode

c) Beschreibung der bevorzugten Kombinationen aus a) und b)

Natürlich ist prinzipiell jede Kombination von Sonde und Katalysator denkbar.

Bevorzugt sind jedoch Kombinationen von Sonden und Enzymkatalysatoren. Hierbei ist insbesondere die Verwendung einfach aufgebauter Sonden zu bevorzugen. Das heißt, dass ein Oligonukleotid mit einem Enzym, vorzugsweise ein Monomer das gegen Denaturierung stabil ist, gekoppelt wird. Insbesondere ist ein Oligonukleotid zu bevorzugen, dass eine intramolekulare Hybridisierung aufweist; bei der ein Einfluss auf die Aktivität des molekularen Schalters erfolgt. Bei dieser Ausführungsform ist insbesondere eine spezielle Ausführung bevorzugt, bei der das frei Ende des Oligonukleotids mit einer Blockierungskomponente ausgestattet ist.

Beispielsweise kann eine Diaphorase mit einem Oligonukleotid über dessen 5' Ende gekoppelt sein. Die Kopplung kann über eine Schiff'sche-Base erfolgen. Hierbei ist es denkbar, dass ein 5' Aldehyd-funktionalisiertes Oligonukleotid mit

einer Aminogruppe der Diaphorase unter Bildung einer Schiffschen-Base kondensiert wurde. Gegebenenfalls wurde diese Schiffsche-Base noch mittels Natriumcyanoborhydrid reduziert, um die hydrolysesensitive Schiffsche-Base in eine stabilere Bindung zu überführen. Das Oligonukleotid weist eine intramolekulare Hybridisierung auf, so dass dessen 3' Ende der Diaphorase zugewandt ist. Das 3' Ende ist mit einer Biotingruppe funktionalisiert. Dies führt zu einer zusätzlichen Reduktion der Aktivität des molekularen Schalters. An diese Biotingruppe ist bevorzugt ein Avidin oder Streptavidin gebunden, so dass die Aktivität des molekularen Schalters zusätzlich minimiert wird.

d) Beschreibung der bevorzugten Analyten nach Oberbegriffen / Substanzklassen

In Bezug auf die Erfindung ist eine Unterteilung in Nukleinsäuren und deren Derivate im Gegensatz zu Analyten, die keine Nukleinsäuren oder deren Derivate sind, sinnvoll. Bei letzteren handelt es sich sowohl um niedermolekulare Substanzen als auch um Makromoleküle.

Prinzipiell kann jedwede Substanz als Analyt in Frage kommen. Hier gibt es ganz unterschiedliche Möglichkeiten der Kategorisierung. Analyten können grundlegend in Atome und Moleküle unterteilt werden. Bei den Substanzen, bei denen es sich um Moleküle handelt, kann beispielsweise nach ihrer Molekülgröße mehr oder minder artifiziell in niedermolekulare Substanzen und höhermolekulare Substanzen, Makromoleküle, unterteilt werden. Des Weiteren kann auch nach Funktionen wie Pharmaka, Hormone, Metabolite, Enzyme, Strukturproteine, Rezeptoren, unterteilt werden. Eine Unterscheidung von Substanzklassen im chemischen Sinne kann in anorganische und organische Substanzen, bei den letzteren nach funktionellen Gruppen erfolgen, d.h. eine Einteilung nach Amiden, insbesondere Peptide und Proteine, Säuren, insbesondere Carbonsäuren oder Phosphorsäuren hier vorzugsweise Nukleinsäuren wie Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren und Derivate, etc.

e) Beschreibung der bevorzugten Kombinationen aus c) und d)



Auch wenn andere Analyten nachgewiesen werden können, ist insbesondere der Nachweis von Nukleinsäuren bevorzugt. Beispielsweise kann HIV-1 über einen in c) beschriebenen Molekularen Schalter nachgewiesen werden, wenn als Oligonukleotid 5'-

GCGAGCCTGGGATTAAATAAAATAGTAAGAATGTATAGCGCTCGC-3' eingesetzt wird. Der unterstrichene Bereich entspricht der Sequenz, die mit dem Analyten, d.h. der Nukleinsäuresequenz des HIV-1 hybridisiert. Die fett markierten Basen dienen zur intramolekularen Hybridisierung der Sonde.

Molekulare Schalter, die mit einer Sonde ausgestattet sind, die aus einer Nukleinsäure bzw. einem Nukleinsäurederivat aufgebaut ist, werden vorzugsweise zum Nachweis von Nukleinsäuren bzw. Nukleinsäurederivaten eingesetzt.

Analyte, bei denen es sich nicht um eine Nukleinsäure bzw. ein Nukleinsäurederivat handelt, werden vorzugsweise mit Molekularen Schaltern nachgewiesen, die mit einer Sonde ausgestattet sind, die Nukleinsäure bzw. Nukleinsäurederivate in Kombination mit mindestens einer Bindungskomponente (Rezeptoren, Enzyme, Antikörper oder deren Bindungsdomänen sowie Affibodies, Designed Repeat Proteins, Protein Scaffolds, Aptamere, etc.) enthalten.

#### f) Beschreibung des Aufbaus und der Handhabung der bevorzugten Testsysteme

Das analytische Testsystem basierend auf dem molekularen Schalter kann flexibel eingesetzt werden. Im Grunde ermöglicht der molekulare Schalter die Registrierung eines Bindungsereignisses. Die Art der Registrierung ist hierbei davon abhängig welche Art von Reaktion stattfindet.

Da energetische Änderungen bei annähernd allen beschriebenen Vorgängen auftreten, beispielsweise bei Enzymreaktionen, kann prinzipiell die Calorimetrie bzw. Microcalorimetrie unter Verwendung von Calorimetern mit den hierfür vorgesehenen Reaktionsgefäßen eingesetzt werden. Ändern sich spektrale Eigenschaften der Lösung, beispielsweise durch Beteiligung von lumineszierenden, insbesondere fluoreszierenden, und absorbierenden Verbindungen, im Besonderen bei

enzymkatalysierten Reaktionen, können optische Messungen durchgeführt werden. Optische Messungen beinhalten hier Luminometrie, Fluorimetrie, Photometrie, Polarimetrie, Polarometrie, etc. unter Verwendung der entsprechenden Geräte und Reaktionsgefäße. Prinzipiell kann auch visuell detektiert werden, d.h. zum Beispiel beim Einsatz von Teststreifen, einfachen Küvetten oder Mikrotiterplatten, etc. Radiometrische Verfahren sind ebenfalls denkbar, wenn bei Reaktionen Radionukleotide eingesetzt werden. Darüber hinaus können auch Verfahren wie die Manometrie eingesetzt werden, die Druckunterschiede registrieren. Dies ist dann von Interesse, wenn osmotische Prozesse ablaufen, aber auch wenn die Bildung oder der Verbrauch von Gasen, beispielsweise beim Einsatz von Decarboxylasen, erfolgt. Bei elektrochemischen Prozessen unter Verwendung von Elektroden sind amperometrische Verfahren und entsprechende Apparaturen, wie sie beispielsweise bei der Polarographie verwendet werden, einzusetzen. Dies schließt auch die Bestimmung von Potentialdifferenzen, Strömen, Impedanzen, etc. und deren Änderung mit ein.

## Ausführungsbeispiele:

### 1. Ausführungsbeispiel

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) wird mit einem Oligonukleotid der Sequenz 5'-gtatctagctatgttgatggtg-3' konjugiert. Die Kopplung des 5'-SH modifizierten Oligonukleotides erfolgt mittels eines heterofunktionalen, nicht spaltbaren, wasserlöslichen Vernetzers. Der Vernetzer Sulfo-EMCS wird entsprechend der Vorschrift von Pierce (Produktblatt) (N.N. 2003-2004) eingesetzt. Diese Konjugation erfolgt vorzugsweise in Gegenwart von Glucose-6-phosphat und/oder  $\beta$ -NADH. Die angegebene Sequenz dient zum Nachweis von Bakteriophagen-lambda DNA ( $\lambda$ ).

Der gereinigte molekulare Schalter G6PDH x  $\lambda$  wird dann zum Nachweis der Bakteriophagen-DNA wie folgt eingesetzt. G6PDH x  $\lambda$  wird mit Proben inkubiert. Bei den Proben handelt es sich um gereinigte DNA, die zuvor thermisch denaturiert wird und somit als Einzelstrang-DNA vorliegt. Die Inkubation erfolgt in 5 bis 500 mM Tris-HCl pH 6,5 bis 10, 5 bis 500 mM NaCl insbesondere jedoch in etwa 50 mM Tris-HCl pH 9, 50 mM NaCl. Die Temperatur liegt zwischen 4 und 70 °C insbesondere jedoch zwischen 30 und 55 °C und bevorzugt bei etwa 35 °C. Nach einer Inkubation von 0,5 bis 60 Minuten insbesondere jedoch zwischen 2 und 10 Minuten bevorzugt etwa 5 Minuten, wird die Nachweisreaktion durch Zugabe von Magnesiumchlorid, Glucose-6-Phosphat und  $\beta$ -NADP nach Bergmeyer (Bergmeyer 1965) gestartet. Der Nachweis erfolgt spektrophotometrisch in einer Quarzküvette mit Hilfe eines Spektrophotometers bei einer Wellenlänge von etwa 340 nm. Die Veränderung der Absorption wird über ein bestimmtes Zeitintervall gemessen und so der Umsatz bzw. die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt. In Gegenwart von Bakteriophagen-DNA wird der Umsatz in Abhängigkeit der Menge von Bakteriophagen-DNA proportional reduziert. Die gebundene Bakteriophagen-DNA versperrt den Substraten den Zugang zum katalytischen Zentrum.

### 2. Ausführungsbeispiel

Beispielsweise wird eine Diaphorase, insbesondere die Diaphorase aus *Clostridium kluyveri*, mit einem Oligonukleotid über dessen 5'-Ende gekoppelt. Die Kopp-

lung erfolgt beispielsweise über den in 1. beschriebenen Weg. Das Oligonukleotid verfügt über eine intramolekulare Hybridisierung, so dass dessen 3'-Ende der Diaphorase zugewandt ist. Das 3'-Ende ist mit einer Biotingruppe funktionalisiert. Dies führt zu einer zusätzlichen Reduktion der Aktivität des molekularen Schalters. In einer besonderen Ausführungsform ist an diese Biotingruppe ein Avidin bzw. Streptavidin gebunden, so dass die Aktivität des molekularen Schalters zusätzlich minimiert wird.

Außerdem hat dies den Vorteil den molekularen Schalter effizient zu reinigen. Das nach der Kopplungsreaktion erhaltenen Konjugat aus Diaphorase und Oligonukleotid wird mittels Gelfiltrationschromatographie von den überschüssigen Oligonukleotiden abgetrennt. Hiernach erfolgte die Konjugation mit Streptavidin. In einer weiteren Gelfiltrationschromatographie wird dann die Diaphorase x Oligonukleotid x Streptavidin-Schalter von anderen Substanzen gereinigt. Die Gelfiltrationschromatographien werden jeweils nach den üblichen Regeln der Technik durchgeführt.

Zum Nachweis von Bakteriophagen-DNA wird beispielsweise das Oligonukleotid 5'-GCGAGCgtatctagctatgttgatggGCTCGC-3' eingesetzt. Der klein geschriebene Bereich entspricht der Sequenz, die mit dem Analyten, d.h. der Nukleinsäuresequenz der Bakteriophagen-DNA hybridisiert. Die fett markierten Basen dienen zur intramolekularen Hybridisierung.

Der gereinigte Molekulare Schalter Diaphorase x  $\lambda$  x Streptavidin (DLS) wird zum Nachweis von Bakteriophagen-DNA wie folgt eingesetzt. DLS wird mit Proben inkubiert. Bei den Proben handelt es sich um gereinigte DNA. Zunächst erfolgt eine Inkubation in 5 bis 500 mM Tris-HCl pH 6 bis 10, insbesondere jedoch in 50 mM Tris-HCl pH 8,6, 50 mM NaCl. Die Temperatur liegt zwischen 4 und 98 °C insbesondere jedoch zwischen 30 und 95 °C und bevorzugt bei etwa 80 °C. Nach einer Inkubation von 0,1 bis 20 Minuten, insbesondere jedoch zwischen 2 und 10 Minuten, bevorzugt etwa 5 Minuten, waren die Nukleinsäuren in Einzelstränge überführt. Danach wurde die Temperatur auf 40 bis 70 °C, insbesondere jedoch auf 50 bis 60 °C, bevorzugt jedoch auf etwa 55 °C gesenkt. In Gegenwart der Bakteriophagen-DNA erfolgt deren Hybridisierung mit der Sonde des molekularen



Schalters. Ist keine Bakteriophagen-DNA vorhanden, kommt es wieder zur Bildung der intramolekular hybridisierten Sonde. Die Nachweisreaktion erfolgt durch Zugabe von Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT),  $\beta$ -NADH und NAD nach Bergmeyer (Bergmeyer 1965). Statt INT werden ggf. andere Tetrazoliumsalze wie Neotetrazoliumchlorid (NT), Thiocarbamylnitroblautetrazoliumchlorid (TCNBT), Tetranitroblautetrazoliumchlorid (TNBT), Nitroblautetrazoliumchlorid (NTB), Benzothiozolylstyrylphthalhydrozidyltetrazoliumchlorid (BSPT), WST-1, WST-3, WST-4, und insbesondere Cyanoditolyltetrazoliumchlorid (CTC) eingesetzt. Der Nachweis erfolgt über die Bestimmung der Absorption bzw. Fluoreszenz in Küvetten oder Mikrotiterplatten unter Verwendung entsprechender Spektrophotometer bzw. Fluorimeter bei den entsprechenden Wellenlängen. Die Veränderung der Signale wird zu einem bestimmten Zeitpunkt oder über ein bestimmtes Zeitintervall gemessen und so der Umsatz bzw. die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt. In Gegenwart von Bakteriophagen-DNA ist der Umsatz in Abhängigkeit der Menge von Bakteriophagen-DNA proportional erhöht. Die gebundene Bakteriophagen-DNA entfernt die Blockierung des Zugangs zum katalytischen Zentrum.

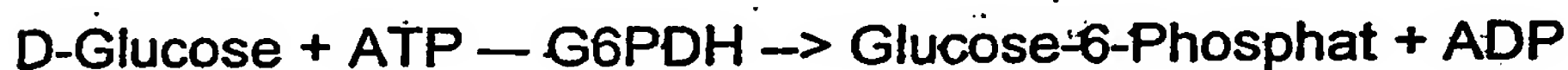
Um eine erhöhte Sensitivität zu erzielen, wird ggf. ein NAD/NADH-Redoxcycling eingeführt, indem zur Reaktion eine Dehydrogenase, insbesondere eine Lactatdehydrogenase oder eine Formiatdehydrogenase und die entsprechenden Substrate, Lactat und Formiat zugegeben werden (Bergmeyer 1965).

### 3. Ausführungsbeispiel

Das unter 2. aufgeführte Ausführungsbeispiel wird dahingehend verändert, dass statt der Diaphorase eine Hexokinase eingesetzt wird. Dabei der Hexokinase ein induced-fit bei der Bindung des Substrates erfolgt, ist der Effekt hier besonders groß. Ist keine Bakteriophagen-DNA zugegen, beeinflusst die intramolekular hybridisierte Sonde überraschend den Vorgang des induced-fit, so dass der Substratumsatz verändert wird. Im Gegensatz hierzu wird die Konformationsänderung zum induced-fit weniger beeinflusst, wenn Bakteriophagen-DNA vorhanden ist und an die Sonde gebunden hat.

#### 4. Ausführungsbeispiel

In einer besonderen Ausführungsform wird die im 3. Ausführungsbeispiel verwendete Hexokinase mit der Sonde 5'-GCGAGCgtatctagctatgttgatgggtgGCTCGC-3' eingesetzt. Der molekulare Schalter ist hier also aus Hexokinase-5'-GCGAGCgtatctagctatgttgatgggtgGCTCGC-3'-Biotin-Streptavidin aufgebaut. Außerdem wird folgender molekularer Schalter eingesetzt: Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase-5'-GCGAGCctgtacgtgtggcagttgctGCTCGC-3'- Biotin-Streptavidin. Die Sonde dieses Schalters dient ebenfalls zum Nachweis von Bakteriophagen-DNA jedoch in einem anderen Sequenzbereich. Die Versuchsbedingungen werden wie unter Ausführungsbeispiel 2 gewählt. In diesem Ansatz wird die Bakteriophagen-DNA jedoch durch zwei Molekulare Schalter nachgewiesen. Dies erhöhte die Spezifität des Nachweises in unerwarteter Weise. Nur wenn beide Bindungsereignisse erfolgreich sind, kann die Gesamtreaktion:



ablaufen. Als Substrate werden D-Glucose, ATP und NADPH in Anlehnung an Bergmeyer verwendet (Bergmeyer 1965) verwendet. Die Oxidation des NADPH wird photometrisch oder fluorimetrisch verfolgt.

Dieses Ausführungsbeispiel zeigt, dass es auch möglich ist ein „Multiplexing“ durchzuführen. Bei der Verwendung von Enzymen, die unterschiedliche Reaktionen katalysieren, die mehr oder minder unabhängig voneinander nachgewiesen werden können und beim Einsatz von Sonden, die verschiedene Analyten nachweisen, können in ein und demselben Ansatz verschiedene Analyten bestimmt werden.

#### 5. Ausführungsbeispiel

In einem weiteren Ausführungsbeispiel wird G6PDH in Anlehnung an die Ausführungen des 1. Ausführungsbeispieles mit dem 5' SH – TGGTTGGTGTGGTTGGT-

3' Oligonukleotidaptamer zur Bindung von humanem alpha-Thrombin (Thrombin) konjugiert. Der gereinigte Molekulare Schalter, G6PDH x Thrombin, wird mit humanem alpha-Thrombin zwischen 4 und 70 °C, vorzugsweise bei etwa 25 °C in etwa 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 5 % (v/v) Glycerol in Verbindung gebracht. Die Bindung des humanen alpha-Thrombin an das Oligonukleotidaptamer und die hierdurch induzierte Konformationsänderung des Oligonukleotidaptamers führt zu einer Aktivitätsänderung des molekularen Schalters, die in einem bestimmten Konzentrationsbereich proportional zur Konzentration des Analyten, des humanen alpha-Thrombin war. Die Aktivität des molekularen Schalters wird entsprechend den Angaben des 1. Ausführungsbeispiels durch die Zugabe der dort beschriebenen Substrate und Verfahrensanweisungen durchgeführt.

## 6. Ausführungsbeispiel

Des Weiteren wird mit den erwähnten Kopplungsmethoden ein Galactose-Oxidase x 5'-GCGAGCgtatctagctatgttgatgggtgGCTCGC-3' x Biotin/Streptavidin Schalter aufgebaut, um Bakteriophagen-DNA nachzuweisen. Bei der Nachweisreaktion, die in Anlehnung an die Beschreibungen in Bergmeyer (Bergmeyer 1965) bzw. in Molecular Probes - Fluorescence Microplate Assays (Molecular Probes 1998) durchgeführt wird, werden verschiedene Substrate eingesetzt. Der Umsatz von galactosyliertem Protein wird stärker durch die Bindung der Bakteriophagen-DNA beeinflusst, als der Umsatz von Galaktose. Die Umsetzung der Galaktose dient als Referenz, um die Gesamtaktivität des Systems bzw. dessen Veränderung durch die Reaktionsbedingungen, beispielsweise durch Nebenreaktionen und Inaktivierungen, einzuschätzen. Der Umsatz des galactosylierten Proteins ist der eigentliche Indikator für die Bindung der Bakteriophagen-DNA. Zur optimalen Bestimmung der Konzentration der Bakteriophagen-DNA werden beide Werte berücksichtigt. Hierzu wird beispielsweise die Differenz oder der Quotient der beiden Aktivitäten eingesetzt.

## 7. Ausführungsbeispiel

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) wird mit einem Oligonukleotid der Sequenz 3'-GCGAGCcatag-5' entsprechend den Beschreibungen des 1. Ausführungsbeispiels konjugiert. Hier erfolgt die Konjugation jedoch über das 3'-Ende. Um eine intermolekular hybridisierte Sonde zu generieren, wird mit 5'-CGCTCGgtatctagctatgttgatgggtg-3' hybridisiert. Die Hybridisierung der intermolekularen Sonde erfolgt somit über den fett markierten Sequenzbereich. Der klein geschriebene Sequenzbereich dient zur Erkennung der Bakteriophagen-DNA. Der kursiv geschriebene Bereich dient sowohl der Hybridisierung der intermolekularen Sonde als auch zur Erkennung der Bakteriophagen-DNA. In besonderen Ausführungsbeispielen ist das Oligonukleotid 5'-CGCTCGgtatctagctatgttgatgggtg-3' am 5'-Ende mit Biotin und ggf. Streptavidin konjugiert.

Weitere besondere Ausführungsbeispiele sind Systeme, bei denen am 5'-Ende weitere Nukleotide angehängt sind, die als Inhibitoren fungieren. Weitere Inhibitoren die hier Verwendung finden sind neben den Nucleosidmonophosphaten auch Nucleosiddiphosphate und Nucleosidtriphosphate, insbesondere ATP, aber auch Myristic acid, Dihydroepiandrosteron, Palmitoyl-CoA. Des Weiteren können bei besonderen Ausführungsbeispielen  $\beta$ -NADH,  $\alpha$ -NADH,  $\beta$ -NADPH,  $\alpha$ -NADPH, G6P und Gluconat-6-phosphat am 5'-Ende konjugiert sein.

Der gereinigte molekulare Schalter G6PDH x  $\lambda$  wird dann zum Nachweis der Bakteriophagen-DNA wie folgt eingesetzt. G6PDH x  $\lambda$  wird mit Proben inkubiert. Bei den Proben handelt es sich um gereinigte DNA, die zuvor thermisch denaturiert worden sind und somit als Einzelstrang-DNA vorliegen. Die Inkubation erfolgt in 5 bis 500 mM Tris-HCl pH 6,5 bis 10, 5 bis 500 mM NaCl insbesondere jedoch in etwa 50 mM Tris-HCl, pH 9, 50 mM NaCl. Die Temperatur liegt zwischen 4 und 80 °C, insbesondere jedoch zwischen 30 und 60 °C und bevorzugt bei etwa 50 °C. Nach einer Inkubation von 0,5 bis 60 Minuten, insbesondere jedoch zwischen 2 und 10 Minuten, bevorzugt etwa 5 Minuten, wird die Nachweisreaktion durch Zugabe von Magnesiumchlorid, Glucose-6-Phosphat und  $\beta$ -NADP nach Bergmeyer (Bergmeyer 1965) gestartet. Die Reaktion wird bei einer Temperatur zwischen 4 und 50 °C, insbesondere jedoch zwischen 10 und 40 °C und bevorzugt bei etwa



37 °C durchgeführt. Der Nachweis erfolgt wie im 1. Ausführungsbeispiel beschrieben.

In Gegenwart von Bakteriophagen-DNA ist der Umsatz in Abhängigkeit der Menge von Bakteriophagen-DNA proportional erhöht. Durch die Bindung der nicht kovalent gebundenen Sondenkomponente an die Bakteriophagen-DNA, wird den Substraten nun der Zugang zum katalytischen Zentrum ermöglicht. Die Wahl der Sequenz und der Versuchsbedingungen verhindert eine signifikante Reassoziaton der Sondenkomponenten sowie die Hybridisierung der kovalent gebundenen Sonde an Bakteriophagen-DNA, die einen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität haben kann.

#### 8. Ausführungsbeispiel

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) wird mit einem Oligonukleotid der Sequenz 5'-gtatctagctatgttgatggtg-3' konjugiert. Die Kopplung des 5'-SH modifizierten Oligonukleotides erfolgt mittels eines wasserlöslichen Vernetzers, der mindestens eine der oben beschriebenen Selektivkomponente wie Ethidiumbromid-homodimer-1 trägt.

Ein entsprechender Schalter [G6PDH x Selektivkomponente x 1Sonde] wird dann zum Nachweis der Bakteriophagen-DNA wie folgt eingesetzt. Der molekulare Schalter wird mit Proben inkubiert. Bei den Proben handelt es sich um gereinigte DNA, die zuvor thermisch denaturiert wird und somit als Einzelstrang-DNA vorliegt. Die Inkubation erfolgt in 5 bis 500 mM Tris-HCl pH 6,5 bis 10, 5 bis 500 mM NaCl insbesondere jedoch in etwa 50 mM Tris-HCl pH 9, 50 mM NaCl. Die Temperatur liegt zwischen 4 und 70 °C insbesondere jedoch zwischen 30 und 55 °C und bevorzugt bei etwa 35 °C. Nach einer Inkubation von 0,5 bis 60 Minuten insbesondere jedoch zwischen 2 und 10 Minuten bevorzugt etwa 5 Minuten, wird die Nachweisreaktion durch Zugabe von Magnesiumchlorid, Glucose-6-Phosphat und  $\beta$ -NADP nach Bergmeyer (Bergmeyer 1965) gestartet. Der Nachweis erfolgt spektrophotometrisch in einer Quarzküvette mit Hilfe eines Spektrophotometers bei einer Wellenlänge von etwa 340 nm. Die Veränderung der Absorption wird über ein bestimmtes Zeitintervall gemessen und so der Umsatz bzw. die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt. In Gegenwart von Bakteriophagen-DNA wird der

Umsatz in Abhängigkeit der Menge von Bakteriophagen-DNA proportional reduziert.

Bei der Bindung von Bakteriophagen-DNA an die Sonde kommt es aufgrund der Gegenwart der Selektivkomponente zu einer dramatischen, unerwarteten Konformationsänderung. Diese Konformationsänderung versperrt den Substraten den Zugang zum katalytischen Zentrum in einer unerwarteten, extrem effizienten Weise. Der Grund hierfür ist die Affinität der Selektivkomponente zu doppelsträngiger DNA. Die Bindung der Selektivkomponente an die doppelsträngige DNA führt zu einer Konformationsänderung der Sonde relativ zur katalytischen Komponente, die den Zugang zum aktiven Zentrum effizient versperrt.

Natürlich können auch wie oben erwähnt Systeme eingesetzt werden, bei denen die Selektivkomponente eine höhere Affinität zu nicht-hybridisierten Nukleinsäuren, beispielsweise einzelsträngige DNA, aufweist. Hier ändern sich die Bindungsvorgänge, Konformationsänderungen und Aktivitäten der molekularen Schalter in entsprechender Weise in Abwesenheit oder Gegenwart eines Analyten. Selbstverständlich sind die Selektivkomponenten mit den in MA 1250 beschriebenen Ausführungsbeispielen kombinierbar.

Literaturliste

- Baraldi, P. G., G. Balboni, et al. (2001). "Design, synthesis, DNA binding, and biological evaluation of water-soluble hybrid molecules containing two pyrazole analogues of the alkylating cyclopropylpyrroloindole (CPI) subunit of the antitumor agent CC-1065 and polypyrrole minor groove binders." *J. Med. Chem.* 44(16): 2536-43.
- Becker, H. G. O., W. Berger, et al. (1993). Organikum: organisch-chemische Grundpraktikum. Berlin, Heidelberg, Johann Ambrosius Barth Leipzig, Edition Deutscher Verlag der Wissenschaften.
- Beier, M., F. Reck, et al. (1999). "Chemical etiology of nucleic acid structure: comparing pentopyranosyl- (2'→4') oligonucleotides with RNA." *Science* 283(5402): 699-703.
- Bergmeyer, H. U. (1965). Methods of Enzymatic Analysis. New York, Academic Press.
- Bisswanger, H. (1994). Enzymkinetik: Theorie und Methoden. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, VCH.
- Britten, R. J. and D. E. Kohne (1968). "Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms." *Science* 161(841): 529-40.
- Fang, Y. Y., B. D. Ray, et al. (2004). "Ni(II).Arg-Gly-His-DNA Interactions: Investigation into the Basis for Minor-Groove Binding and Recognition." *J Am Chem Soc* 126(17): 5403-12.
- Forrer, P., M. T. Stumpp, et al. (2003). "A novel strategy to design binding molecules harnessing the modular nature of repeat proteins." *FEBS Lett* 539(1-3): 2-6.
- Galau, G. A., R. J. Britten, et al. (1977). "Studies on nucleic acid reassociation kinetics: rate of hybridization of excess RNA with DNA, compared to the rate of DNA renaturation." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 74(3): 1020-3.
- Haugland, R. P. (2002). Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR.
- Hesse, M., H. Meier, et al. (1995). Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Stuttgart, New York, Thieme.

- Hintsche, R. (1999). "Elektrische DNA-Chiptechnologie." Medizinische Genetik **11**: 12-13.
- Howley, P. M., M. A. Israel, et al. (1979). "A rapid method for detecting and mapping homology between heterologous DNAs. Evaluation of polyomavirus genomes." J Biol Chem **254**(11): 4876-83.
- Kurreck, J., E. Wyszko, et al. (2002). "Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids." Nucleic Acids Res **30**(9): 1911-8.
- Leitch, I. J. and J. S. Heslop-Harrison (1994). "Detection of digoxigenin-labeled DNA probes hybridized to plant chromosomes in situ." Methods Mol Biol **28**: 177-85.
- Meinkoth, J. and G. Wahl (1984). "Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports." Anal Biochem **138**(2): 267-84.
- Molecular Probes, I. (1998). Fluorescence Microplate Assays, Molecular Probes Inc.
- Mullis, K. B., Kensington, C.A. (1987). Process for amplifying nucleic acid sequences. US-4683202.
- Nelson, D. and M. Cox (2001). Lehninger Biochemie. Heidelberg, New York, etc., Springer.
- Nielsen, P. E. and M. Egholm (1999). "An introduction to peptide nucleic acid." Curr Issues Mol Biol **1**(1-2): 89-104.
- Pierce, Perbio. (2003-2004) Handbook & Catalog.
- Rehm, H. (2002). Der Experimentator Proteinbiochemie/Proteomics. Berlin, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Rosu, F., V. Gabelica, et al. (2002). "Triplex and quadruplex DNA structures studied by electrospray mass spectrometry." Rapid Commun Mass Spectrom **16**(18): 1729-36.
- Saiki, R. K., S. Scharf, et al. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**(4732): 1350-4.
- Shim, Y. H., P. B. Arimondo, et al. (2004). "Relative DNA binding affinity of helix 3 homeodomain analogues, major groove binders, can be rapidly screened by displacement of prebound ethidium bromide. A comparative study." Org. Biomol. Chem. **2**(6): 915-21.



- Skerra, A. (2000). "Lipocalins as a scaffold." Biochim Biophys Acta 1482(1-2): 337-50.
- Skerra, A. (2001). "Anticalins": a new class of engineered ligand-binding proteins with antibody-like properties." J Biotechnol 74(4): 257-75.
- Smith, D., B. D. Collins, et al. (2003). "Sensitivity and Specificity of Photoaptamer Probes." Mol Cell Proteomics 2(1): 11-18.
- Smith, M. J., R. J. Britten, et al. (1975). "Studies on nucleic acid reassociation kinetics: reactivity of single-stranded tails in DNA-DNA renaturation." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 72(12): 4805-9.
- Stolowitz, M. L., G. Li, et al. (2002). 1,2-Phenylenediboronic acid reagents and complexes. EP 1 264 833 A2.
- Torsvik, V., F. L. Daae, et al. (1998). "Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments." J Biotechnol 64(1): 53-62.
- Torsvik, V., J. Goksoyr, et al. (1990). "High diversity in DNA of soil bacteria." Appl Environ Microbiol 56(3): 782-7.
- Vitzthum, F. and J. Bernhagen (2002). SYBR Green I: An ultrasensitive fluorescent dye for double-stranded DNA quantification in solution and other applications. Recent Res. Devel. Anal. Biochem. S. G. Pandalai. Kerala, India, Transworld Research Network. 2: 65-93.
- Vitzthum, F., H. Bisswanger, et al. (2000). Biotechnologisch relevante Enzyme aus Katzenhaien. Amtsaktenzeichen, Patentanmeldung, DE-10007531.2.
- Zipper, H., C. Buta, K. Lammle, H. Brunner, J. Bernhagen, F. Vitzthum. (2003). "Mechanisms underlying the impact of humic acids on DNA quantification by SYBR Green I and consequences for the analysis of soils and aquatic sediments." Nucleic Acids Res 31(7): e39.

## Patentansprüche

1. Analytisches Testsystem umfassend einen molekularen Schalter, der eine Sonde und eine katalytische Komponente aufweist.
2. System nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Sonde mit der katalytischen Komponente direkt oder über eine Kopplungskomponente konjugiert ist.
3. System nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass durch den Kontakt eines zu bestimmenden Analyten mit der Sonde die katalytische Aktivität des molekularen Schalters verändert wird.
4. System nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Änderung der katalytischen Aktivität des molekularen Schalters auf einer durch den Analyten hervorgerufenen Konformationsänderung der Sonde beruht.
5. System nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Sonde oder als deren Bestandteil eine Nukleinsäure oder ein Nukleinsäurederivat verwendet wird.
6. System nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Sonde oder als deren Bestandteil eine Ribonukleinsäure, eine Desoxyribonukleinsäure, eine Peptide Nucleic Acid oder eine Locked Nucleic Acid verwendet wird.
7. System nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die als Sonde oder Sondenbestandteil verwendete Nukleinsäure oder das Nukleinsäurederivat in hybridisierter Form vorliegt.

8. System nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass als Sonde oder Sondenbestandteil ein Oligonukleotid verwendet wird.
9. System nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das als Sonde oder Sondenbestandteil verwendete Oligonukleotid eine intramolekulare Hybridisierung aufweist.
10. System nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass als katalytische Komponente oder als deren Bestandteil ein Enzym, ein Antikörper, eine katalytisch aktive Nukleinsäure oder ein katalytisch aktives Nukleinsäurederivat verwendet wird.
11. System nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass als katalytische Komponente oder als deren Bestandteil eine katalytisch aktive Ribonukleinsäure, Desoxyribonukleinsäure, Peptide Nucleic Acid oder Locked Nucleic Acid verwendet wird.
12. System nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass als katalytische Komponente oder als deren Bestandteil ein Enzym verwendet wird.
13. Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer Probe, wobei ein analytisches Testsystem oder ein molekularer Schalter gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 12 verwendet wird.
14. Verwendung eines molekularen Schalters gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 12 zur Bestimmung eines Analyten in einer Probe.
15. Verwendung eines analytischen Testsystems gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 12 zur Bestimmung eines Analyten in einer Probe.

16. Verwendung nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Analyten um eine Nukleinsäure oder ein Nukleinsäurederivat handelt.
17. Molekularer Schalter gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 12.



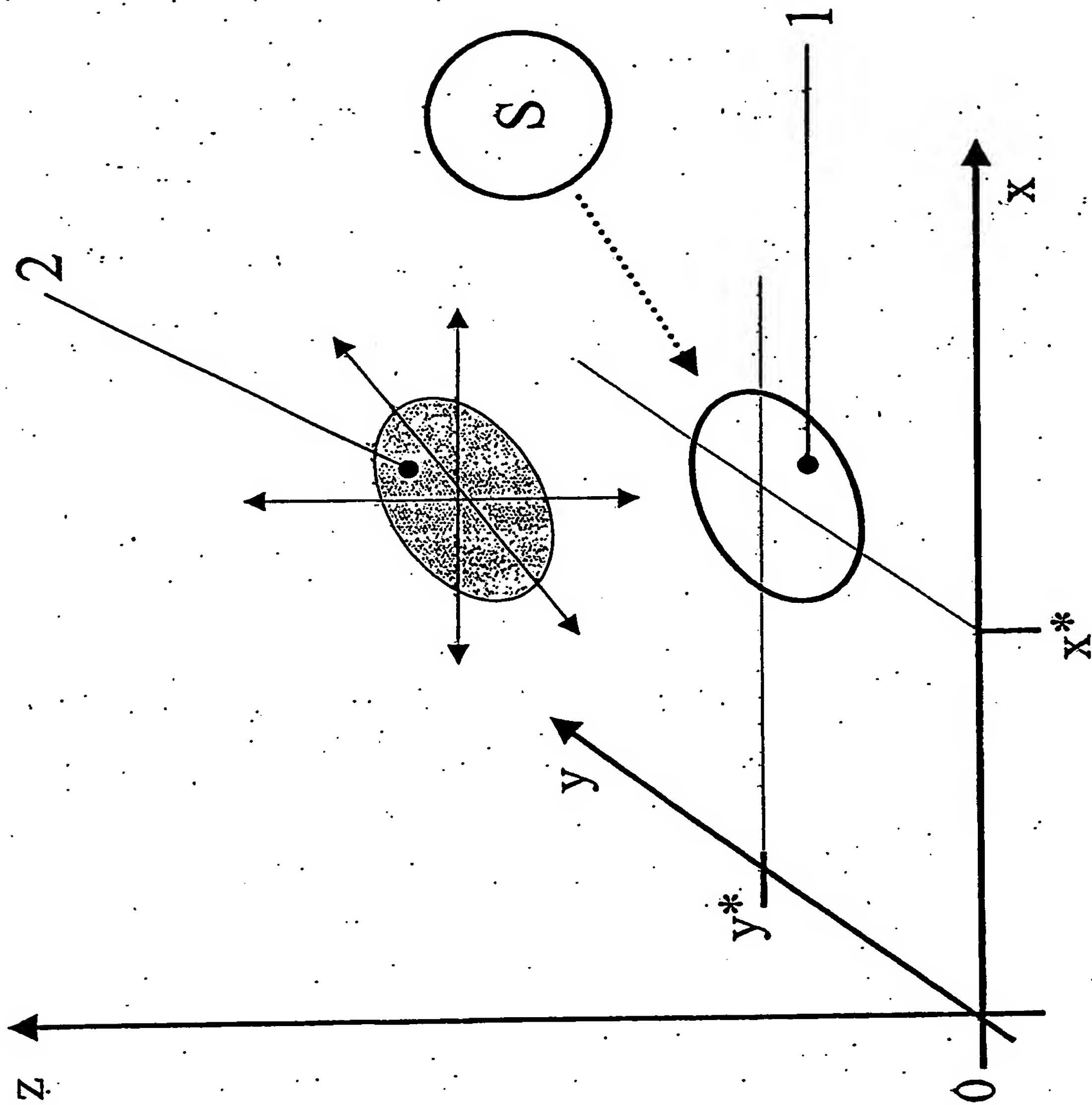


Abbildung 1

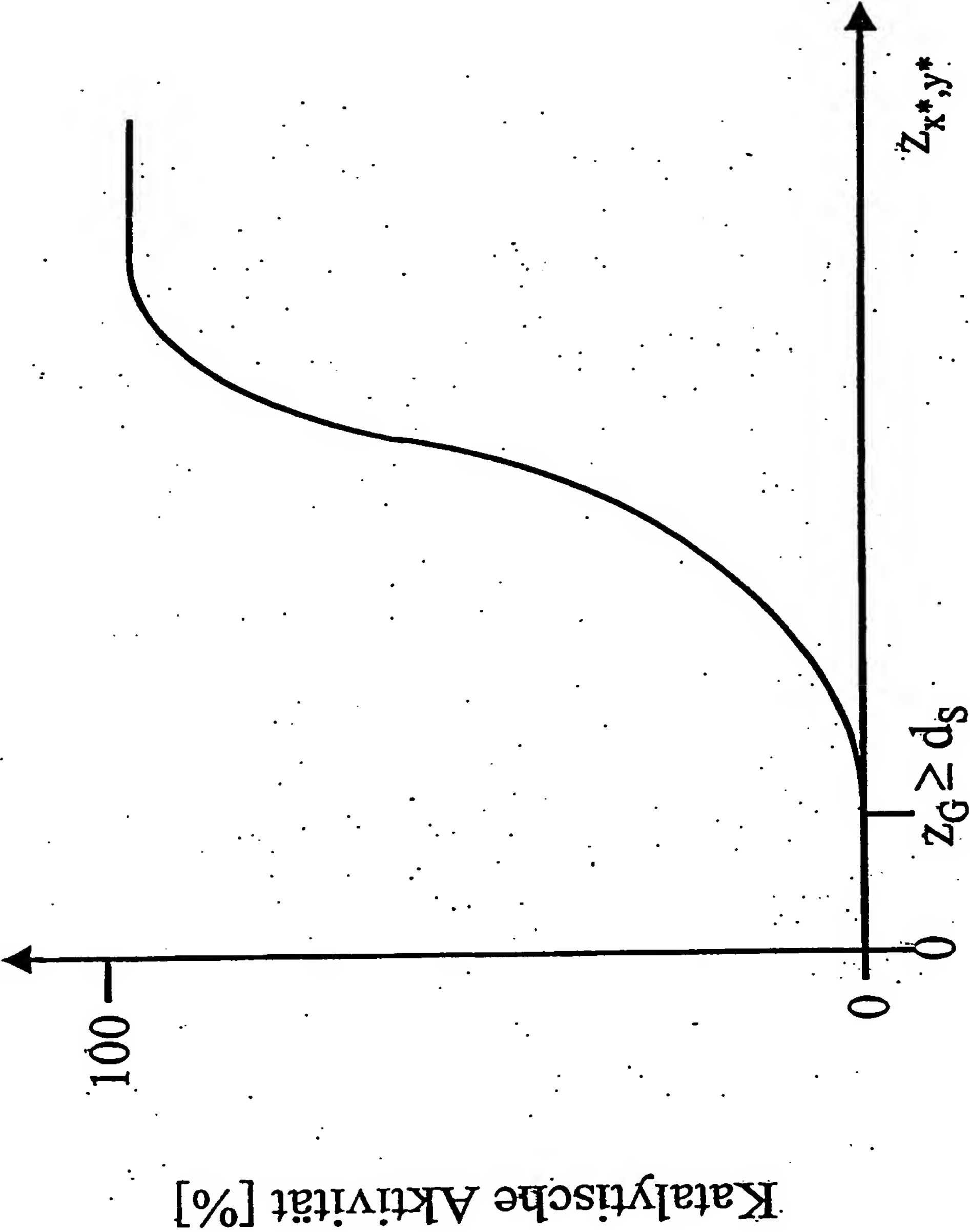


Abbildung 2

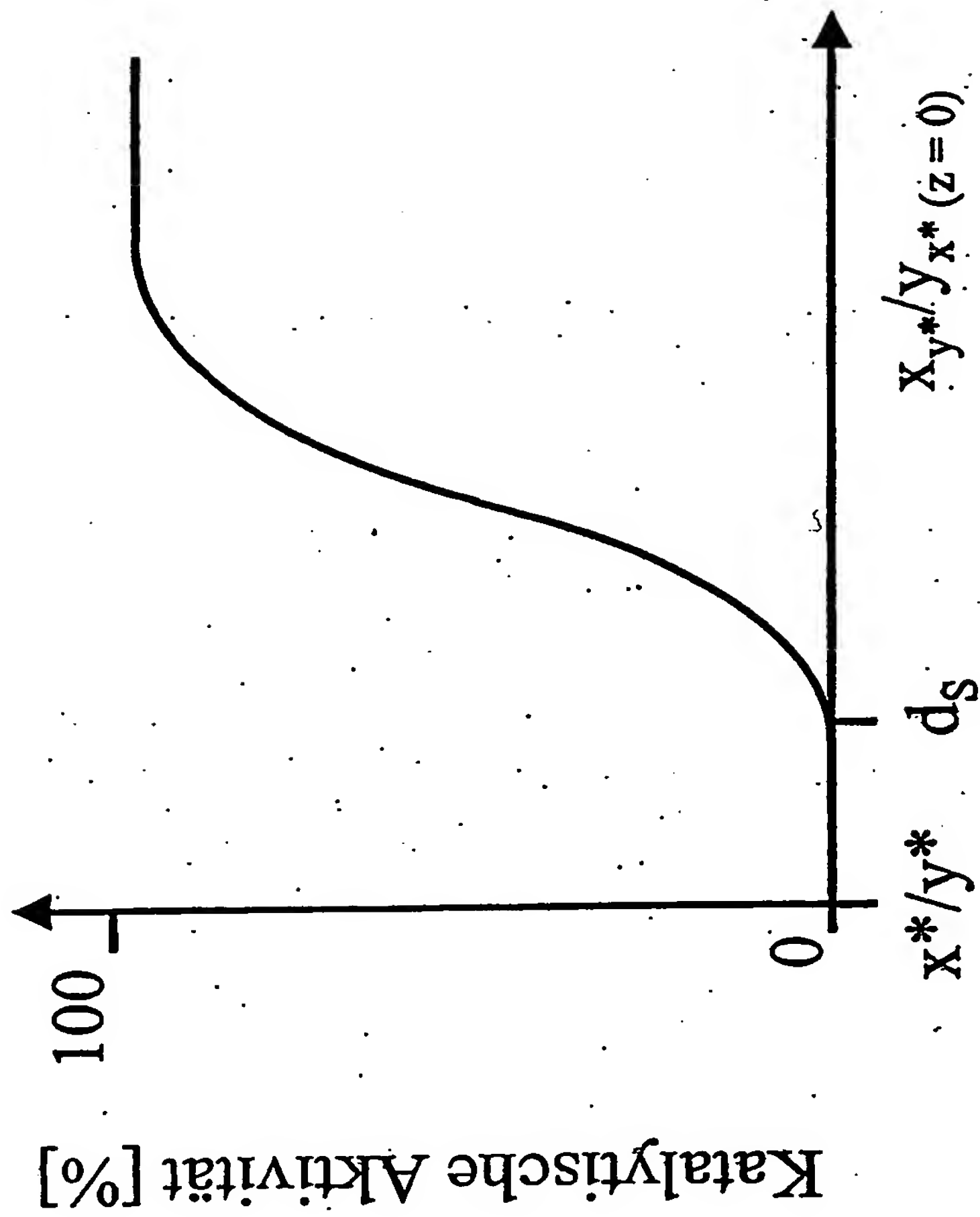


Abbildung 3

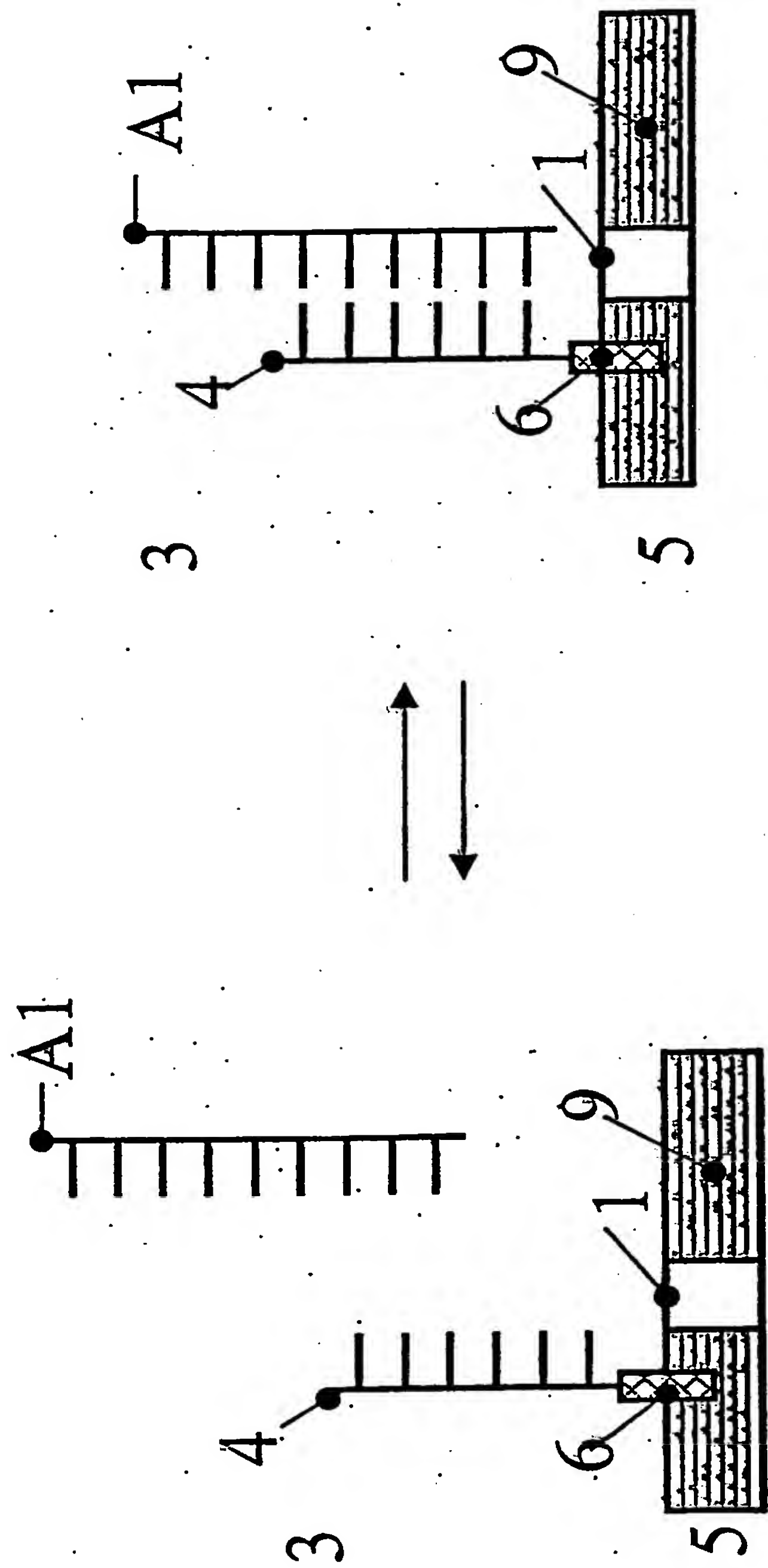


Abbildung 4



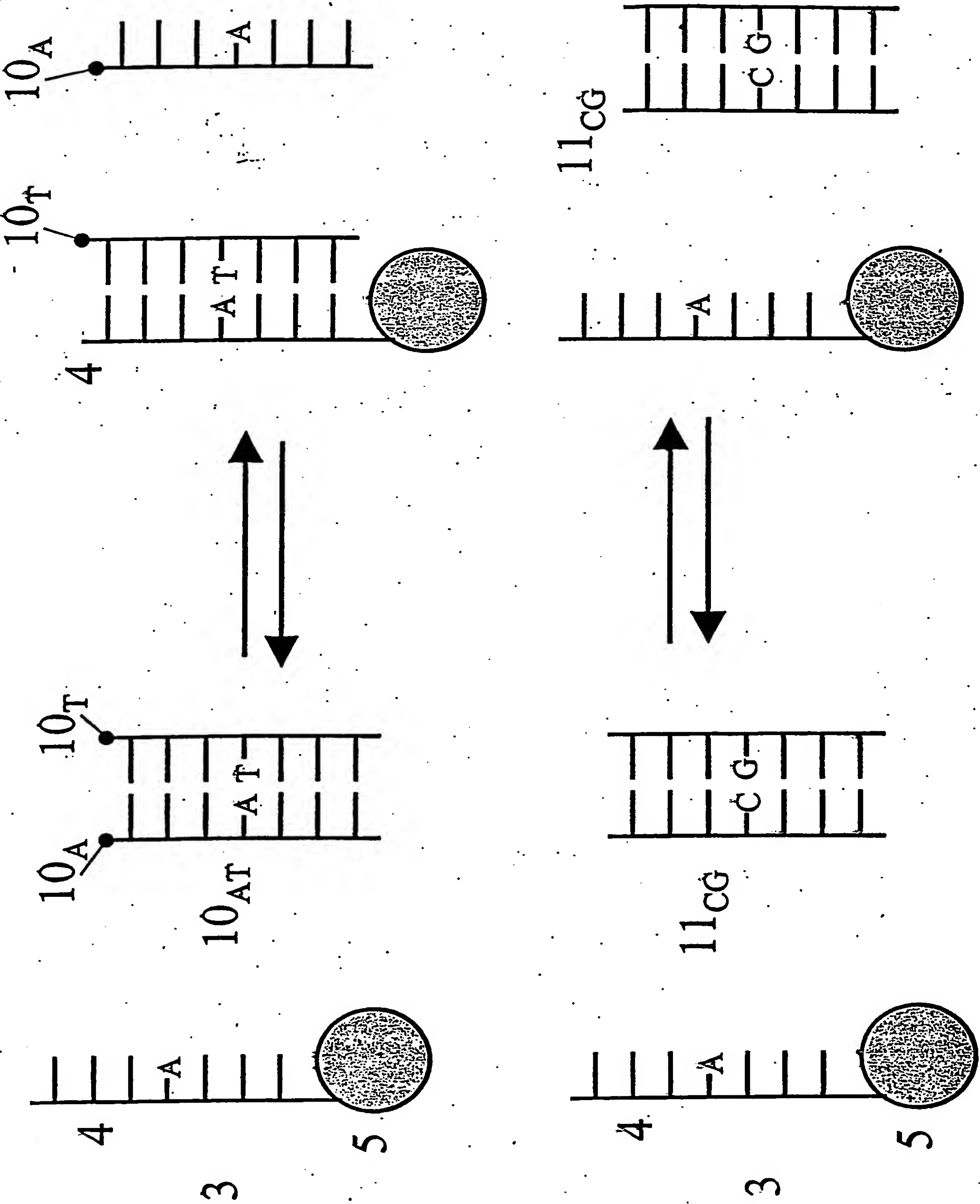


Abbildung 5

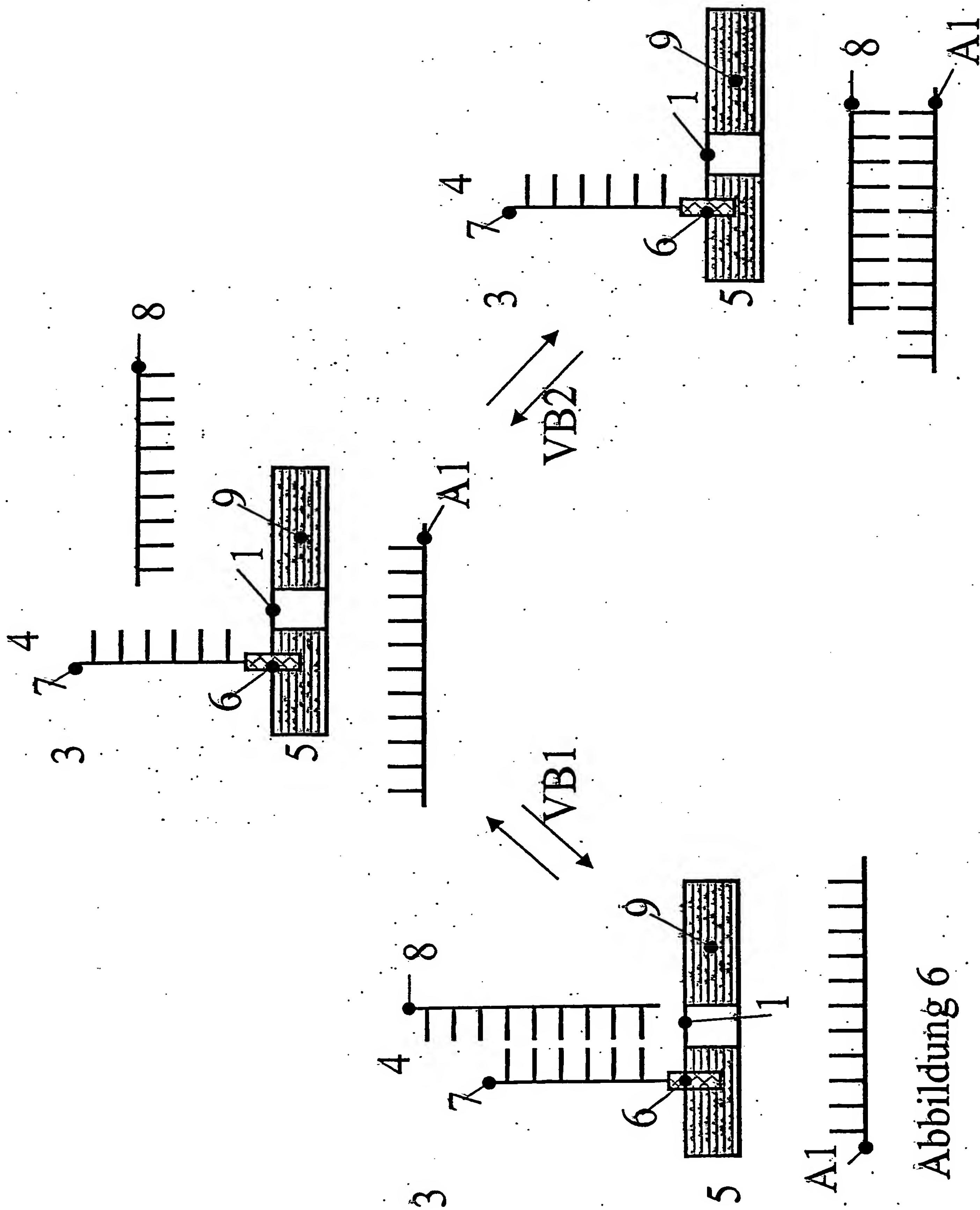


Abbildung 6

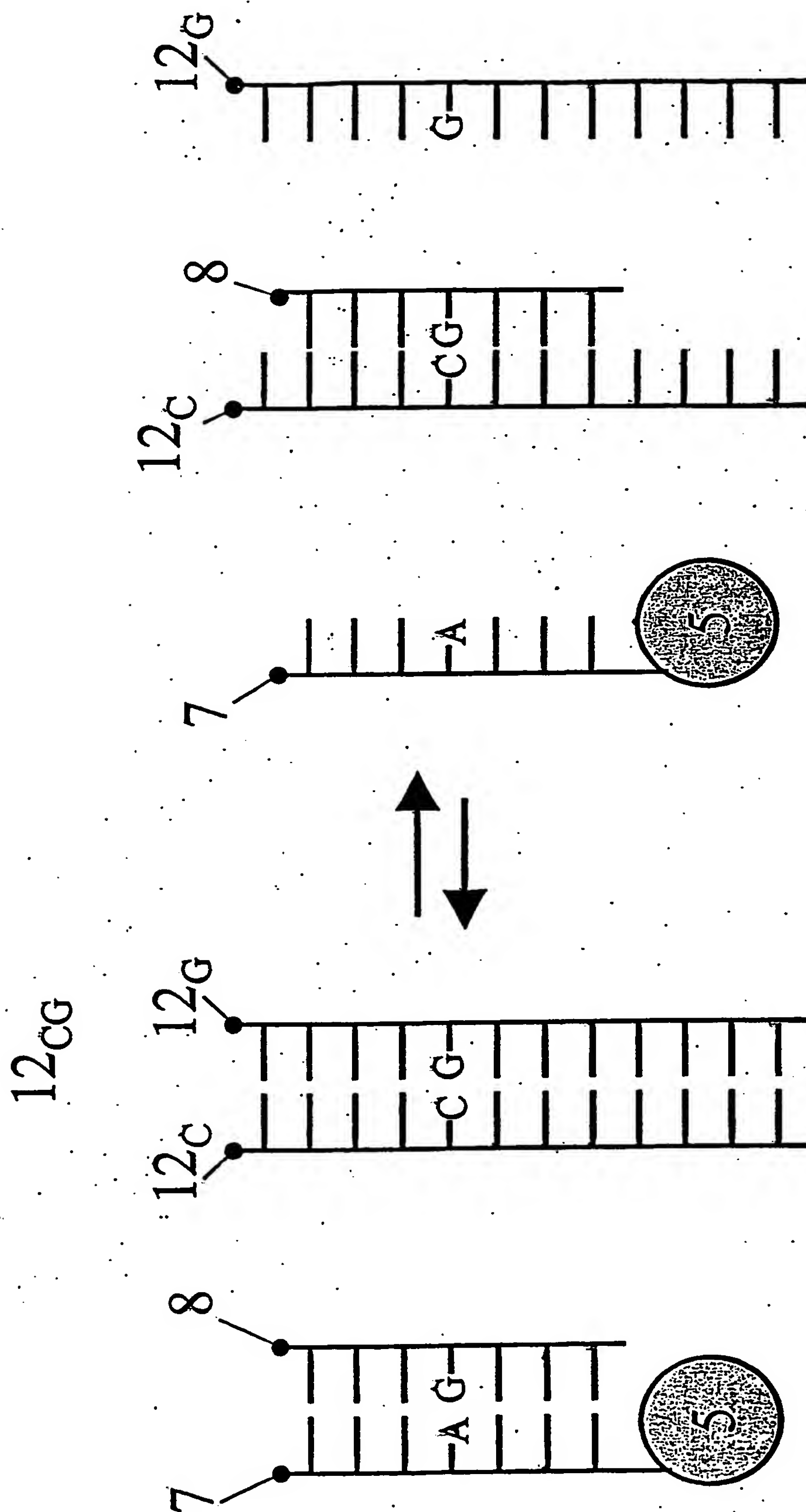


Abbildung 7

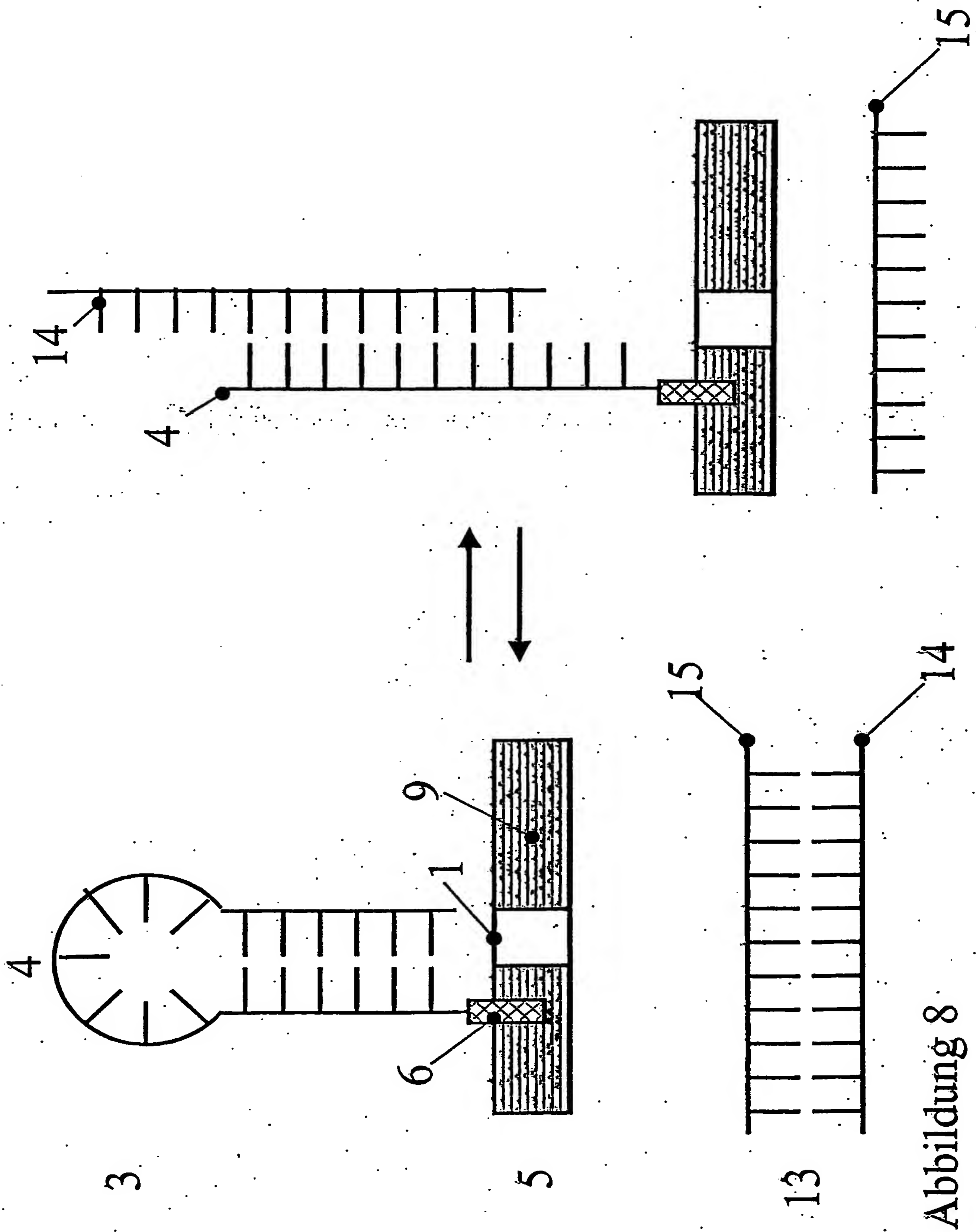


Abbildung 8



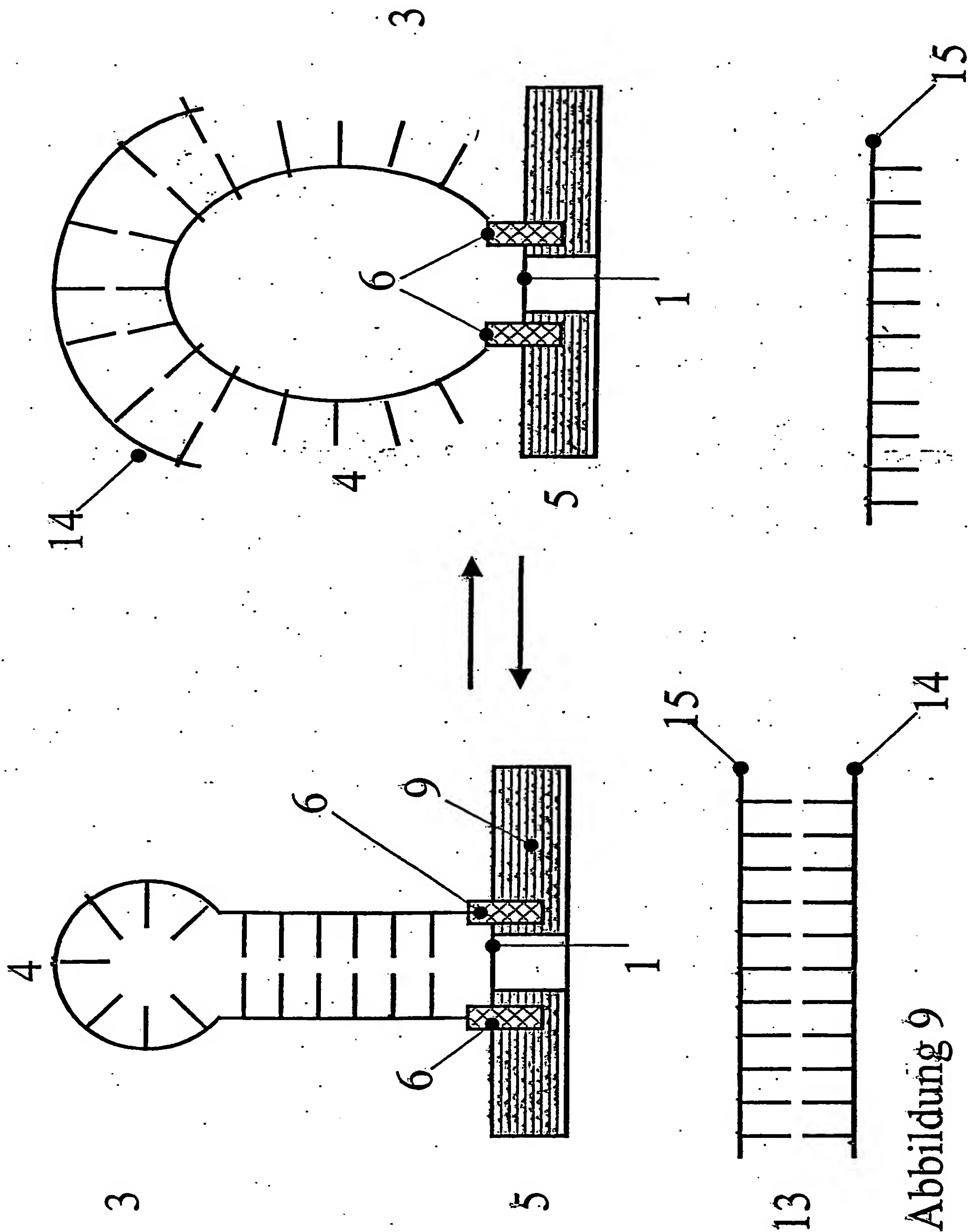


Abbildung 9

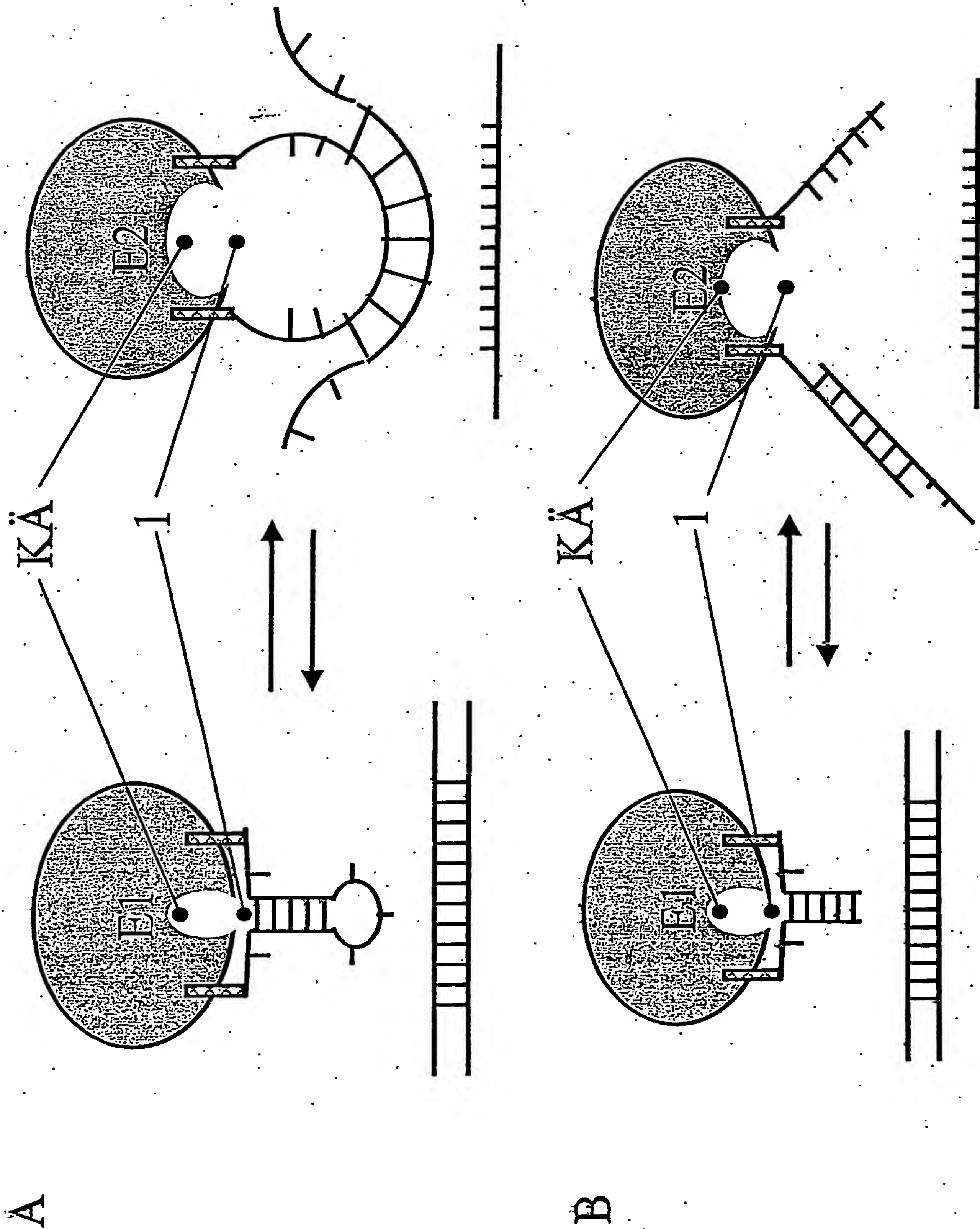


Abbildung 10

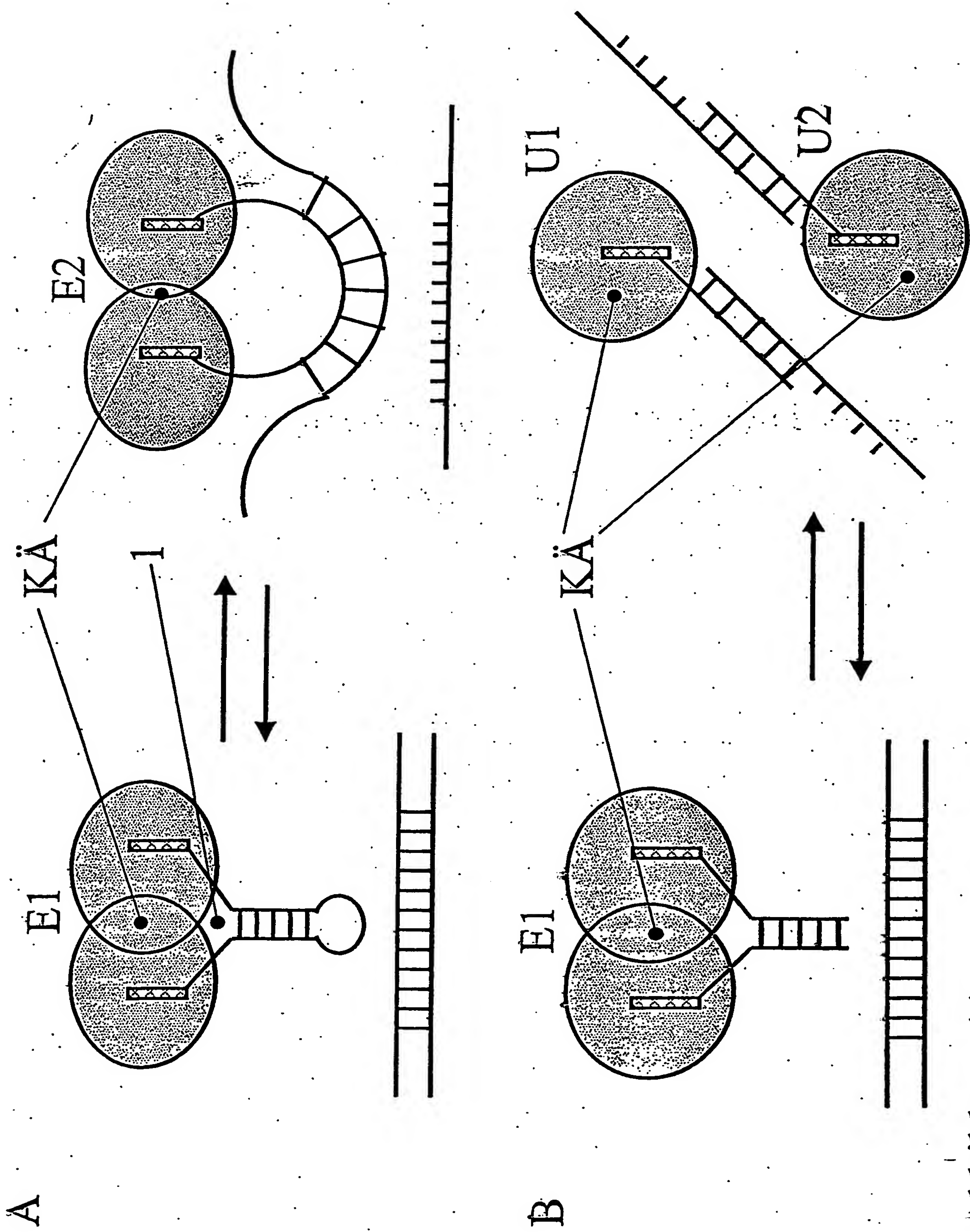


Abbildung 11

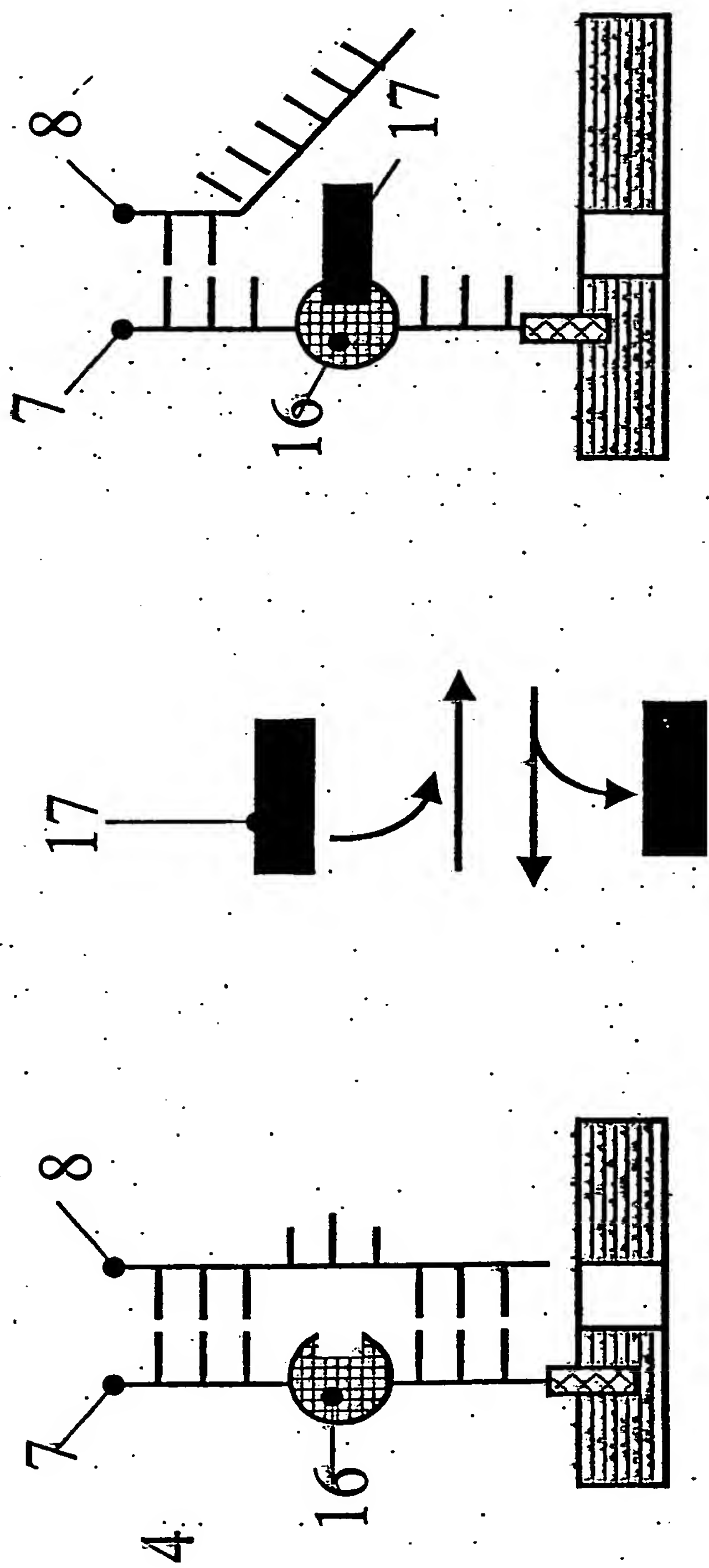


Abbildung 12



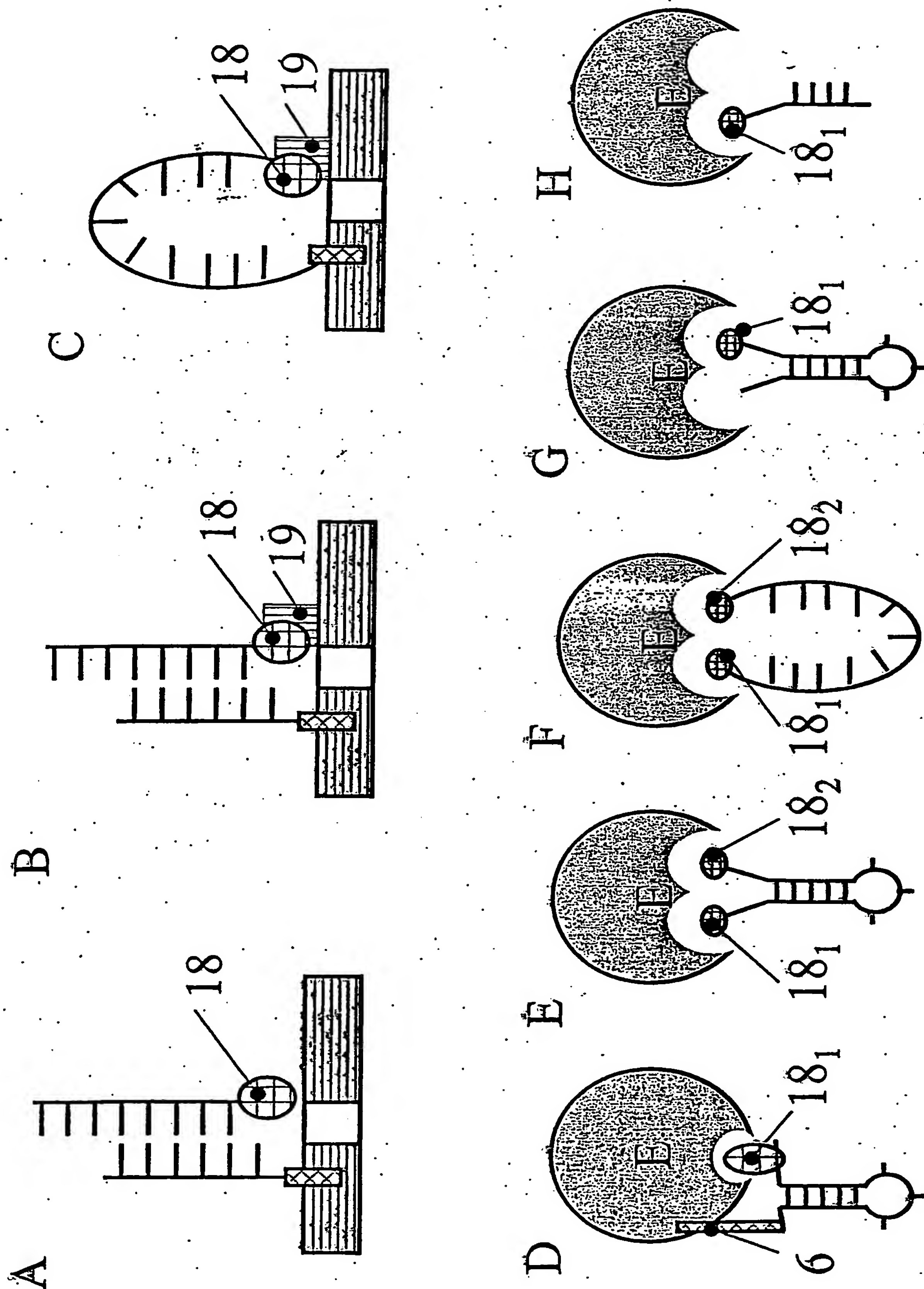


Abbildung 13

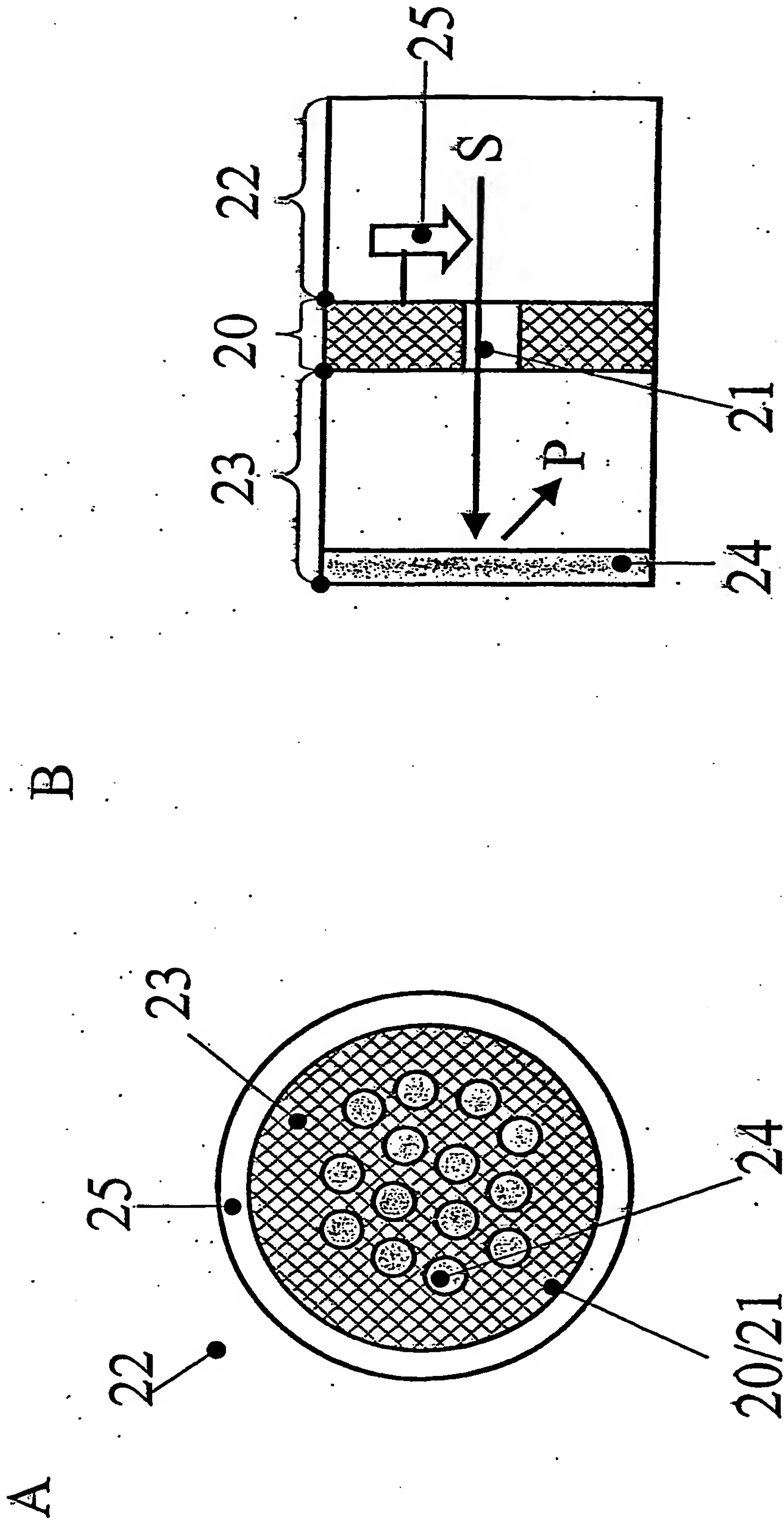


Abbildung 14

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**